

**Ein *Air-liquid Interface*-Zellkulturmodell zur
Untersuchung der frühen Antwort humaner
Bronchialepithelzellen auf Auslöser einer
Asthma-Exazerbation**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Johanna Christine Ehlers

Kiel, 2019

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Heinz Fehrenbach

Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 2019

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 <i>Asthma bronchiale</i>	5
1.1.1 Die Atemwegserkrankung <i>Asthma bronchiale</i>	5
1.1.2 Die Entstehung von allergischem Asthma	6
1.1.3 Die inflammatorische Antwort beim allergischen eosinophilen Asthma	7
1.1.4 <i>Remodeling</i> -Prozesse in asthmatischen Atemwegen	9
1.2 Das Atemwegsepithel.....	11
1.2.1 Der Aufbau des Atemwegsepithels.....	11
1.2.2 Die Funktionen des Atemwegsepithels.....	13
1.2.2 Die Rolle des Atemwegsepithels bei der Pathogenese von Asthma	14
1.3 Asthma-Exazerbationen	15
1.3.1 Auftreten, Konsequenzen und Definition der Asthma-Exazerbation	15
1.3.2 Die Auslöser von Asthma-Exazerbationen	16
1.3.3 Der Verlauf einer virus-induzierten Asthma-Exazerbation	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material.....	21
2.1 Allgemeine Reagenzien und Chemikalien	21
2.2 Puffer	22
2.3 Zellkulturmedien und Stimulantien	23
2.4 Oligonukleotide	24
2.5 Molekulare Gewichtsmarker und Ladepuffer	25
2.6 Normalseren und Antikörper	26
2.7 Kits	26
2.8 Verbrauchsmaterialien.....	27

2.9 Geräte.....	27
2.10 Programme und Websites.....	28
3 Methoden.....	29
3.1 Zellkultur.....	29
3.1.1 Humane Bronchialepithelzellen	29
3.1.2 Kultivierung und Passagieren von humanen Bronchialepithelzellen	31
3.1.3 Kryokonservierung von humanen Bronchialepithelzellen	32
3.1.4 <i>Air-liquid Interface</i> -Zellkultur	32
3.1.5 Stimulation von ALI-Kulturen	33
3.2 Histopathologie	35
3.2.1 Aufarbeitung von ALI-Kulturen für histologische Untersuchungen.....	35
3.2.2 Perjodsäure-Schiff-Färbung.....	35
3.2.3 Mukus-Quantifizierung von ALI-Kulturpräparaten	36
3.2.4 Immunhistochemische Färbung.....	37
3.3 RNA-Expressionsanalyse	39
3.3.1 RNA-Isolierung und Aufreinigung.....	39
3.3.2 cDNA-Synthese	39
3.3.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion.....	40
3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese	40
3.3.5 Transkriptomanalyse	41
3.4 Statistische Auswertung.....	45
4 Ergebnisse	46
4.1 Ein <i>in vitro</i> Modell des humanen Atemwegsepithels zur Untersuchung einer Asthma-Exazerbation.....	46
4.1.1 Humane Bronchialepithelzellen differenzieren unter ALI-Zellkulturbedingungen zu einem pseudostratifizierten Epithel.....	46
4.1.2 rhIL-13 induziert im ALI-Epithel einen Th ₂ -polarisierten epithelialen Phänotyp....	51
4.1.3 Der TLR3-Ligand Poly(I:C) induziert eine antivirale Entzündungsreaktion in ALI-Epithelien von NHBEs.....	57

4.1.4 Eine kombinierte Stimulation mit rhIL-13 und Poly(I:C) als <i>in vitro</i> Modell einer Asthma-Exazerbation	63
4.2 Untersuchung des Transkriptoms von NHBEs und DHBECs.....	73
4.2.1 Stimulation eines ALI-Epithels mit rhIL-13 führt zu einer stark erhöhten Expression von <i>CLCA1</i>	74
4.2.2 Poly(I:C) induziert eine erhöhte Expression von <i>CXCL10</i> , <i>CCL20</i> und <i>OASL</i>	76
4.2.3 Das <i>in vitro</i> Modell einer Asthma-Exazerbation zeigt ein kombiniertes Expressionsprofil aus rhIL-13- beziehungsweise Poly(I:C)-induzierten Genen.....	79
4.3 Identifizierung von potentiellen Biomarkern einer Asthma-Exazerbation	82
5 Diskussion.....	93
6 Literaturverzeichnis	117
Anhang.....	139
I Expression von <i>Pattern Recognition Receptors</i>	139
II <i>Heat Maps</i> der Genexpressionsmuster.....	140
III Abkürzungsverzeichnis	146
Eidesstattliche Versicherung	151
Danksagung	152

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Strukturelle Veränderungen in Atemwegen von Asthmatikern	10
Abb. 1.2: Aufbau des humanen bronchialen Atemwegsepithels	12
Abb. 3.1: Darstellung der verschiedenen Passagen während der Kultivierung humaner Bronchialepithelzellen	32
Abb. 3.2: <i>Air-liquid Interface</i> -Zellkulturmodell	33
Abb. 3.3: <i>In vitro</i> Modell eines Th ₂ -polarisierten epithelialen Phänotyps, einer antiviralen Inflammation und einer Asthma-Exazerbation	34
Abb. 3.4: Aufarbeitung von ALI-Kulturen für histologische Untersuchungen	35
Abb. 3.5: Beispielhafte Darstellung der Auswertungen der Microarrays	44
Abb. 4.1: Der Verlauf der <i>in vitro</i> Ausbildung eines mehrreihigen Atemwegsepithels	47
Abb. 4.2: Genexpression von zelltyp-spezifischen Markern des <i>in vitro</i> Epithels während der Differenzierung	48
Abb. 4.3: <i>In vitro</i> Differenzierung von ALI-Epithelien zu einem mukoziliären Phänotyp	50
Abb. 4.4: Genexpression phänotyp-spezifischer Gene in einem <i>in vitro</i> Th ₂ -polarisierten ALI-Epithel	53
Abb. 4.5: rhIL-13-abhängige Zunahme an Becherzellen und intrazellulär gespeichertem Mukus in ALI-Epithelien von NHBEs und DHBEs	56
Abb. 4.6: Relative Genexpression entzündungsrelevanter Gene nach Poly(I:C)-Stimulation in ALI-Zellkulturen von NHBEs	60
Abb. 4.7: Morphologie von ALI-Epithelien nach Poly(I:C)-Applikation	62
Abb. 4.8: Relative Expression ausgewählter Gene in ALI-Zellkulturen von NHBEs im <i>in vitro</i> Modell einer Asthma-Exazerbation	65
Abb. 4.9: Morphologie von ALI-Epithelien des <i>in vitro</i> Modells einer Asthma-Exazerbation von NHBEs	67
Abb. 4.10: Relative Expression ausgewählter Gene in ALI-Zellkulturen von DHBEs im <i>in vitro</i> Modell einer Asthma Exazerbation	69
Abb. 4.11: Morphologie von ALI-Epithelien des <i>in vitro</i> Modells einer Asthma-Exazerbation von DHBEs	70
Abb. 4.12: Vergleich der relativen Expression rhIL-13- und Poly(I:C)-induzierter Gene in ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBEs im <i>in vitro</i> Modell einer Asthma-Exazerbation	72
Abb. 4.13: Funktionelles Netzwerk der potentiellen Biomarker des <i>in vitro</i> Modelle einer Asthma-Exazerbation mit NHBEs	87

Abb. 4.14: Funktionelles Netzwerk der potentiellen Biomarker des <i>in vitro</i> Modells einer Asthma-Exazerbation mit DHBECs	92
Abb. A.1: <i>In vitro</i> Expression der <i>Pattern Recognition Receptors</i> TLR3, RIG-I und MDA5 in ALI-Epithelien von NHBECs	139
Abb. A.2: <i>Heat Map</i> von unstimulierten und rhIL-13-behandelten ALI-Zellkulturen von NHBECs	140
Abb. A.3: <i>Heat Map</i> von unstimulierten und rhIL-13-behandelten ALI-Zellkulturen von DHBECs	141
Abb. A.4: <i>Heat Map</i> von unstimulierten und Poly(I:C)-behandelten ALI-Zellkulturen von NHBECs	142
Abb. A.5: <i>Heat Map</i> von unstimulierten und Poly(I:C)-behandelten ALI-Zellkulturen von DHBECs	143
Abb. A.6: <i>Heat Map</i> von unstimulierten und rhIL-13- und Poly(I:C)-kostimulierten ALI-Zellkulturen von NHBECs	144
Abb. A.7: <i>Heat Map</i> von unstimulierten und rhIL-13- und Poly(I:C)-kostimulierten ALI-Zellkulturen von DHBECs	145

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verwendete Reagenzien und Chemikalien	21
Tab. 2.2: Zellkulturmedien, Reagenzien für die Zellkultur und eingesetzte Stimulantien	24
Tab. 2.3: Primersequenzen für die qRT-PCR	24
Tab. 2.4: Quantitect Primer Assays für die qRT-PCR	25
Tab. 2.5: Normalseren, primäre und sekundäre Antikörper	26
Tab. 2.6: Verwendete kommerzielle Kits	26
Tab. 2.7: Verwendete Verbrauchsmaterialien	27
Tab. 2.8: Verwendete Geräte	27
Tab. 2.9: Verwendete Computerprogramme und Websites	28
Tab. 3.1: Detaillierte Informationen zu den Spendern der NHBEs	29
Tab. 3.2: Detaillierte Informationen zu den Spendern der DHBEs	30
Tab. 3.3: Verwendete mRNA-Proben für die Transkriptomanalyse	42
Tab. 4.1: Relative Genexpressionen von <i>TNF-α</i> , <i>IL-6</i> , <i>IFN-β</i> , <i>IFN-λ1</i> , <i>IP-10</i> und <i>IL-8</i> zur Charakterisierung einer antiviralen Entzündungsreaktion in einem <i>in vitro</i> Epithel	59
Tab. 4.2: Vergleich der relativen Genexpressionen von <i>TNF-α</i> , <i>IL-6</i> , <i>IFN-β</i> , <i>IFN-λ1</i> , <i>IP-10</i> und <i>IL-8</i> in ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBEs im <i>in vitro</i> Modells einer Asthma-Exazerbation	71
Tab. 4.3: Die 25 Gene mit den höchsten <i>Fold Changes</i> in rhIL-13-behandelten ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBEs	75
Tab. 4.4: Die 25 Gene mit den höchsten <i>Fold Changes</i> in Poly(I:C)-behandelten ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBEs	78
Tab. 4.5: Die 25 Gene mit den höchsten <i>Fold Changes</i> in rhIL-13- und Poly(I:C)-kostimulierten ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBEs	80
Tab. 4.6: <i>Fold Changes</i> der unstimulierten, rhIL-13- und Poly(I:C)-behandelten ALI-Zellkulturen von NHBEs	84
Tab. 4.7: <i>Fold Changes</i> der unstimulierten, rhIL-13- und Poly(I:C)-behandelten ALI-Zellkulturen von DHBEs	90

Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege. Neben der Inflammation ist Asthma durch weitere pathologische Merkmale wie eine Atemwegshyperreagibilität und strukturelle Veränderungen sowie eine veränderte mukoziliäre Clearance gekennzeichnet. Bei durchschnittlich 24 % der Asthma-Patienten kommt es zu wiederkehrenden Verschlimmerungen der Krankheit, den sogenannten Asthma-Exazerbationen, die mit einem erhöhten Bedarf an Medikamenten, Krankenhausaufenthalten und einer verschlechterten Lebensqualität verbunden sind. Bis heute können diese Exazerbationen weder verhindert noch frühzeitig erkannt werden. Das Atemwegsepithel spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von Asthma. Weiterhin ist es essentiell in Asthma-Exazerbationen involviert, da es respiratorischen Viren, den Hauptauslösern von Exazerbationen, als Zielzellen der Infektion dient. In dieser Arbeit wurde deshalb ein *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation entwickelt und das Atemwegsepithel als Quelle für potentielle Biomarker der frühen Phase einer Asthma-Exazerbation *in vitro* untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein 3D-Zellkulturmodell zur Nachstellung einer Asthma-Exazerbation etabliert und charakterisiert. Die verwendeten primären humanen Bronchialepithelzellen von lungen-gesunden und asthmatischen Spendern bildeten *in vitro* unter *Air-liquid Interface* (ALI-) Zellkulturbedingungen nach 28 Tagen ein pseudostratifiziertes Atemwegsepithel, welches aus Basalzellen, zilienträgenden Zellen und sekretorischen Zellen bestand. Durch Stimulation mit rekombinantem humanen Interleukin-13 (rhIL-13) differenzierte dieses Epithel zu einem mukösen Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyp. Dieser war durch eine Becherzellmetaplasie und die Expression von unter anderem dem Hauptmucin *MUC5AC* sowie *CCL26*, *CLCA1* und *SerpinB2* charakterisiert. Da der Großteil der Asthma-Exazerbationen durch respiratorische Viren ausgelöst wird, wurde das virale Surrogat Poly(I:C), welches die doppelsträngige RNA eines sich replizierenden Virus nachstellt, zur Induktion einer antiviralen Inflammation eingesetzt. Durch die Kombination der Gabe von rhIL-13 und Poly(I:C) wurde *in vitro* in ALI-Kulturen von lungen-gesunden und asthmatischen Spendern eine epitheliale Antwort ausgelöst, die sowohl morphologisch als auch in Bezug auf bekannte Mediatoren einer Asthma-Exazerbation sehr ähnlich war. So wurde die Genexpression einiger pro-inflammatorischer Zytokine, Interferone und chemotaktischer Zell-

Lockstoffe einer Exazerbation signifikant induziert. Durch Gesamt-Transkriptomanalysen wurde die Nähe des etablierten *in vitro* Modells der frühen epithelialen Antwort einer Asthma-Exazerbation zur *in vivo* Situation in einem unabhängigen experimentellen Ansatz bestätigt. Im zweiten Teil wurden mithilfe der Gesamt-Transkriptomanalysen sechs Gene identifiziert, deren Proteinprodukte als potentielle Biomarker der frühen Phase einer Asthma-Exazerbation dienen könnten. Diese Kandidaten sind IL-6, IP-10, ISG15, MCP-1, RANTES und TNF- α .

Außerdem konnten beim Vergleich der Antwort des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation mit Zellen lungen-gesunder und asthmatischer Spender Unterschiede in der Genexpression nachgewiesen werden. So waren einige Gene, wie zum Beispiel IP-10, in Zellkulturen von asthmatischen Spendern signifikant gegenüber lungen-gesunden Spendern erhöht. Diese Unterschiede ließen sich nicht mit dem experimentellen Aufbau oder dem Modell des unstimulierten differenzierten ALI-Epithels erklären, da sich diese bei den Experimenten nicht unterschieden. Dementsprechend könnten diese Unterschiede zum Beispiel auf epigenetische Modifikationen zurückzuführen sein, die die primären humanen Bronchialepithelzellen bei der De- und Re-Differenzierung beibehalten. In Anschlussuntersuchungen zur vorgelegten Arbeit werden die Methylierungsmuster von *in vitro* Epithelien von lungen-gesunden und asthmatischen Spendern im *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation analysiert.

Abstract

Bronchial asthma is a chronic inflammatory disease of the airways. It is characterised by pathological features such as airway hyperresponsiveness, structural changes and a dysregulated mucociliary clearance. Some patients suffer from recurrent worsening of the disease termed asthma exacerbations associated with a higher demand for medication, hospitalization and decreased quality of life. To date, these exacerbations cannot be predicted nor prevented at an early stage. The airway epithelium plays an important role in the pathophysiology of asthma and respiratory viruses target epithelial cells. Therefore, in this thesis an *in vitro* model of asthma exacerbations was developed. This model was used for further investigating the *in vitro* epithelial response aiming at the identification of potential biomarkers characteristic of the early processes of an asthma exacerbation.

In this thesis, a 3D-cell culture model mimicking an asthma exacerbation was established and characterised. In this model, primary human bronchial epithelial cells derived from healthy and asthmatic donors were cultured under air-liquid interface (ALI-) conditions for 28 days to build up a pseudostratified epithelium composed of basal cells, ciliated cells and secretory cells. When these cultures were stimulated with recombinant human interleukin-13 (rhIL-13), a mucosal Th₂-polarised epithelial phenotype was generated. This *in vitro* generated epithelial phenotype was characterised by a goblet cell metaplasia and the expression of the main mucin *MUC5AC* plus *CCL26*, *CLCA1* and *SerpinB2*. Most asthma exacerbations are triggered by infections with respiratory viruses. Therefore, the viral surrogate Poly(I:C) that mimic double-stranded RNA of replicating viruses, was used to induce an antiviral inflammation *in vitro*. The application of rhIL-13 and Poly(I:C) were combined to provoke an epithelial response in ALI-cell cultures of healthy and asthmatic donors similar to an asthma exacerbation *in vivo*. The epithelial response was associated with morphological features and gene expression changes similar to processes *in vivo* during an asthma exacerbation. Thus, gene expression of various pro-inflammatory cytokines, interferons and chemoattractants of an exacerbation were induced. Whole-genome transcriptome analyses confirmed the proximity of the established *in vitro* ALI-model of the early epithelial response during an asthma exacerbation to the *in vivo* situation.

Furthermore, the whole-genome transcriptome analysis revealed six mediators which were identified as potential biomarkers for the early phase of an asthma exacerbation. These candidates are IL-6, IP-10, ISG15, MCP-1, RANTES and TNF- α .

Moreover, comparisons of ALI-cell cultures from healthy and asthmatic donors stimulated with rhIL-13 and Poly(I:C) to mimic an asthma exacerbation had demonstrated differences regarding the gene expression levels. For example, the gene expression of IP-10 was significantly increased in ALI-cultures of bronchial epithelial cells from asthmatics compared with those of donors with healthy lungs. These changes cannot be explained with the experimental set-up or the morphology of unstimulated ALI-epithelia from healthy and asthmatic donors, because both do not differ. These findings might be explained for example with epigenetic modifications that are conserved in the basal cells during de- and re-differentiation. In subsequent analysis of this thesis, patterns of methylation will be investigated using *in vitro* epithelia from healthy and asthmatic donors in the *in vitro* model of asthma exacerbations.

1 Einleitung

1.1 *Asthma bronchiale*

1.1.1 Die Atemwegserkrankung *Asthma bronchiale*

Asthma bronchiale zählt zu den häufigsten chronischen Lungenerkrankungen. Während in 2013 ungefähr 242 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen waren, schätzte das *Global Asthma Network* in 2018 bereits einen Anstieg auf 339 Millionen Erkrankte weltweit (1, 2). Die Anzahl an betroffenen Patienten soll bis zum Jahr 2025 auf 400 Millionen Fälle ansteigen (3). Vor allem in wirtschaftsstarken Ländern ist die Prävalenz von Asthma sehr hoch. Studien aus den Jahren 2002 und 2003 ergaben, dass in Australien mit 21,5 % die höchste Prävalenz ermittelt wurde, gefolgt von Schweden (20,2 %), den Vereinigten Königreichen (18,2 %), den Niederlanden (15,3 %) und Brasilien (13,0 %) (4). Für die Untersuchung der weiteren Verbreitung von Asthma werden seit 2017 bis einschließlich 2019 aktuelle Daten ermittelt (1). Trotz der hohen Prävalenz gilt Asthma nur in weniger als 1 % aller Todesfälle als Todesursache. Schätzungen der *Global Burden of Disease Collaboration* zufolge, starben in 2016 420.000 Menschen an Asthma, sprich mehr als 1.000 Menschen pro Tag. Die Gesamtkosten für diese Erkrankung betrugen zwischen 1999 und 2002 alleine in Europa 19,3 Milliarden Euro. Zu diesen Kosten zählen direkte Aufwendungen für Medikamente, Behandlungen und Krankenhausaufenthalte, aber auch indirekte Kosten, die durch Arbeitszeitausfälle und Einschränkungen der Arbeitskraft entstehen. Dementsprechend zählt *Asthma bronchiale* zu einer der ökonomischen Hauptbelastungen für die Gesundheitssysteme (1).

Die Relevanz von *Asthma bronchiale* ist sehr hoch, da die Prävalenz weiter ansteigt, die Krankheit häufig im Kindes- beziehungsweise Jungendalter entsteht und bisher nicht heilbar ist. *The Global Initiative for Asthma (GINA)* definiert *Asthma bronchiale* als eine heterogene Erkrankung, die durch eine chronische Entzündung der Atemwege charakterisiert ist. Damit verbunden sind klinische Symptome wie eine Atemflusslimitierung, ein pfeifendes Atmen (Giemen), Atemnot, ein Engegefühl in der Brust und Husten, welche sowohl im zeitlichen Verlauf als auch in der Intensität schwanken (2). Pathologische Merkmale von Asthma sind neben der chronischen Atemwegsentzündung, eine Atemwegshyperreagibilität (AHR)

gegenüber verschiedenen Substanzen, strukturelle Veränderungen der Atemwege (*Remodeling*) und eine veränderte mukoziliäre Clearance (5).

Da schon früh erkannt wurde, dass Asthma eine heterogene Erkrankung ist, wurden ursprünglich zwei Klassen definiert: Das atopische (extrinsische) Asthma charakterisiert durch messbares Immunglobulin E (IgE) gegen verschiedene Allergene und das nicht-allergische (intrinsische) Asthma. Der Großteil der Patienten ist dem atopischen Asthma zuzuordnen (6). Weitere Untersuchungen haben jedoch zusätzliche Unterschiede gefunden, sodass verschiedene Phänotypen basierend auf klinischen und morphologischen Merkmalen oder im Zusammenhang mit der Behandlung unterschieden werden (7, 8). Der Phänotyp impliziert allerdings keine pathophysiologischen Mechanismen, welche sich bei Asthma grundlegend unterscheiden können, sodass zusätzlich die Unterscheidung anhand des Endotyps für eine spezifischere Therapie eingeführt wurde. Der Endotyp wird nach molekularen Mechanismen und den charakteristischen molekularen Mediatoren klassifiziert (8).

1.1.2 Die Entstehung von allergischem Asthma

Bis heute ist noch nicht genau verstanden, wie Asthma entsteht. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass die Initiierung auf einem Zusammenspiel aus körpereigenen und umweltbedingten Faktoren während der Entwicklung des Immunsystems basiert (9).

Beim allergischen eosinophilen Asthma wird von einem verschobenen Gleichgewicht zwischen der Typ-1 T-Helferzellen (Th_1)-vermittelten Immunantwort in Richtung der Typ-2 T-Helferzellen (Th_2)-vermittelten Antwort ausgegangen (9). Während Zytokine der Th_1 -assoziierten Inflammation für die Immunantwort gegen Infektionen verantwortlich sind, werden durch die aktivierten Th_2 -Zellen Zytokine für die allergische Entzündung freigesetzt (9, 10). Im Rahmen der Hygiene-Hypothese wird davon ausgegangen, dass für die Ausbildung des Gleichgewichtes der Th_1 - und Th_2 -Immunantwort der Kontakt mit Viren, Bakterien und anderen Umweltfaktoren von großer Bedeutung ist (11-15). Durch fehlenden Kontakt behält das Kind während seiner Entwicklung eine Th_2 -verbundene Immunantwort, welche mit pro-inflammatorischen Zytokinen einhergeht, wodurch eine allergische Reaktion bei nachfolgendem Kontakt mit Umweltallergenen begünstigt wird (9, 11). Vor allem der Kontakt mit Allergenen von Hausstaubmilben und Schaben werden mit der Sensibilisierung und somit dem erhöhten Risiko der Entstehung von Asthma in Verbindung gebracht (16, 17).

Infektionen mit Parainfluenzaviren und dem respiratorischen syncytialen Virus (RSV) können eine Bronchiolitis und immer wieder auftretenden Husten auslösen. Treten diese Infektionen zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung in anfälligen Kindern auf, können diese ein Risikofaktor für die Entstehung von Asthma sein. Diese erhöhte Anfälligkeit wird durch genetische Faktoren und eine abnormale Immunantwort der Kinder gesteuert (18, 19). Es wurden bereits genetische Modifikationen beschrieben, die in Prozesse der Pathophysiologie von Asthma involviert sind und somit die Initiierung und Chronifizierung begünstigen (20, 21). Zusätzlich werden weitere Umweltfaktoren wie Zigarettenrauch, verschmutzte Luft und Übergewicht als Risikofaktoren für die Initiierung und Chronifizierung von Asthma diskutiert (13).

1.1.3 Die inflammatorische Antwort beim allergischen eosinophilen Asthma

Die Mehrheit der Asthma-Patienten zeigt einen allergischen eosinophilen Phänotyp (22), in dessen Pathophysiologie Th₂-Zellen eine zentrale Rolle übernehmen. Diese Form der Erkrankung entsteht oftmals im Kindesalter und wird von anderen allergischen Erkrankungen wie atopischer Dermatitis und allergischer Rhinitis begleitet (22, 23).

Eingeatmete Allergene werden zunächst von dendritischen Zellen im Atemwegsepithel aufgenommen und durch Cathepsin S prozessiert (24-26). Diese Allergene sind sehr unterschiedlich, aber oftmals Proteasen wie Der p 1 und Der p 9, zwei Allergene aus der Hausstaubmilbe. Pollenallergene dagegen enthalten lipophile Prostaglandin-E-ähnliche Phytostane (25). Vor allem dendritische Zellen, welche den Interferon-regulierenden Faktor 4 (IRF4) und Integrin α -M (CD11b) exprimieren, nehmen Allergene der Hausstaubmilbe auf (27, 28). Parallel zur Internalisierung und Prozessierung durch die dendritischen Zellen produzieren Atemwegsepithelzellen die Interleukine IL-1 α und IL-1 β nach einem Allergenkontakt. IL-1 β ist an der Rekrutierung von dendritischen Zellen beteiligt, indem es die Produktion rekrutierungsrelevanter Chemokine durch interstitielle Lungenfibroblasten induziert. IL-1 α dagegen wirkt autokrin auf die Epithelzellen und induziert so die Produktion der Zytokine *Thymic Stromal Lymphopoietin* (TSLP), Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und IL-33, welche für die Aktivierung der dendritischen Zellen wichtig sind. Die Epithelzellen synthetisieren zusätzlich IL-25 und IL-33, welche zusammen mit TSLP und GM-CSF Typ-2 innate lymphoide Zellen (ILC2) zur Produktion von IL-13 anregen, wodurch die Migration der gereiften dendritischen Zellen zu lokalen Lymphknoten unterstützt wird (29).

IL-25, IL-33 und TSLP induzieren außerdem die Expression vom OX40-Liganden (OX40L) auf den dendritischen Zellen (30, 31), welcher für die spätere Th₂-Reifung eine wichtige Rolle spielt (32). Die chemotaktischen Signale für die Migration der gereiften dendritischen Zellen in die Lymphknoten wird über die Chemokinrezeptoren CCR7 und dessen Liganden CCL19 und CCL21 vermittelt (33). In den Lymphknoten präsentieren die dendritischen Zellen anschließend Peptidfragmente der Allergene über Moleküle des Hauptkompatibilitätskomplexes II (MHC II) naiven T-Zellen (26). Der essentielle Schritt der Sensibilisierung ist die Aktivierung der T-Zellen durch die Interaktion mit den präsentierten Antigenen. Für die Bindung an den T-Zellrezeptor ist zusätzlich die Bindung der kostimulierenden Moleküle CD80 oder CD86 auf den dendritischen Zellen an CD28 auf den T-Zellen essentiell (34, 35). Die darauffolgende Reifung zur Th₂-Zelle findet durch die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 durch die aktivierte T-Zelle in Anwesenheit von IL-4 statt (36). Die Produktion von IL-4 wird durch die Interaktion vom Tumornekrosefaktor-Rezeptor OX40 auf T-Zellen und OX40L auf den dendritischen Zellen induziert (32, 37). Zusätzlich wird die antigen-induzierte Proliferation und Reifung der Th₂-Zellen durch die Freisetzung von IL-1 β durch Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, glatte Muskelzellen und Epithelzellen unterstützt (38-40). Die gereiften Th₂-Zellen werden nun durch die Chemokine CCL11, CCL24, CCL26, CCL7, CCL13, CCL17 und CCL22 zurück zu den Atemwegen rekrutiert (41, 42). Dort produzieren Th₂-Zellen verschiedene Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und GM-CSF, deren Freisetzung essentielle Mechanismen der Entzündungsreaktion in Asthma induzieren (40, 43, 44).

IL-4 und IL-13, welche von Th₂-Zellen sezerniert werden, leiten in B-Zellen den Isotypenklassenwechsel zu IgE und dessen Produktion ein (45, 46). Dieses IgE kann an den hochaffinen IgE Rezeptor FC ϵ RI auf Mastzellen binden. Diese Mastzellen werden bei einem erneuten Kontakt mit dem Allergen durch die Bindung und Kreuzvernetzung des Antigens und der IgE-FC ϵ RI-Komplexe aktiviert (47). Als Teil dieser frühen Antwort werden Mastzellmediatoren wie Histamin, Leukotrien D₄, Proteasen und Prostaglandin D₂ durch die Degranulation der Mastzellen freigesetzt (40, 48-50). Diese Mediatoren wiederum induzieren die Vasodilation, Kontraktion der glatten Muskulatur sowie Mukus-Sekretion und sind in Prozesse der AHR involviert (47). Außerdem können Mastzellen den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) bilden, welcher in den Atemwegen von Asthmatikern hochreguliert ist und zur AHR beiträgt (51-53). Mastzellen können auch bei Kontakt mit einem IgE-unabhängigen

aktivierenden Stimulus die Migration der dendritischen Zellen in die lokalen Lymphknoten und die Induktion der Th₂-Immunantwort veranlassen (47).

Eine weitere wichtige Zellpopulation bei der allergischen Inflammation ist die Population der Eosinophilen. Sie wurden bei Patienten mit stabilem Asthma in den Wänden der Atemwege und bei unkontrolliertem Asthma im Sputum und in der bronchoalveolären Lavage (BAL) nachgewiesen (54, 55). Eosinophile sind im Gegensatz zu den Mastzellen, die der schnellen Immunreaktion zuzurechnen sind, der späten inflammatorischen Antwort zuzuordnen. Die CD34⁺-Vorläuferzellen der Eosinophilen werden durch freies IL-3 und GM-CSF aus dem Knochenmark rekrutiert und beide Mediatoren leiten weiterhin die Differenzierung ein. IL-5, welches von Th₂-Zellen produziert und sezerniert wird, ist für die weitere Reifung, Migration in die Atemwege, Aktivierung, und das Überleben der Eosinophilen essentiell (56-59). Die Rekrutierung der Eosinophilen zum Ort der Entzündung wird durch die Eotaxine CCL11, CCL24 und CCL26, die Monozyten-chemotaktischen Proteine MCP-3, MCP-4 und das Chemokin *Regulated On Activation, Normal T cell Expressed and Secreted* RANTES (CCL5) vermittelt (40). Die reifen Eosinophilen enthalten granuläre basische Proteine wie MBP (*Major Basic Protein*), EPO (eosinophile Peroxidase) und ECP (eosinophiles kationisches Protein), Eikosanoide wie Prostacyclin PGI₂, Cysteinylleukotriene und Superoxide, welche zur Schädigung des Atemwegsepithels und der Entstehung der AHR beitragen (58, 59).

1.1.4 *Remodeling*-Prozesse in asthmatischen Atemwegen

Neben den inflammatorischen Prozessen weisen die Atemwege von Asthmatikern auch strukturelle Veränderungen auf, die für die Pathophysiologie dieser Krankheit charakteristisch sind. Diese strukturellen Veränderungen werden als *Remodeling* bezeichnet und tragen zur typischen AHR und stetigen Verschlechterung der Lungenfunktion beim chronischen und schwergradigem Asthma bei (60).

Die Atemwege von Asthma-Patienten weisen stark verdickte Wände auf, wodurch der Radius des Lumens stark verringert ist (Abb. 1.1). Diese Verdickungen korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung (61). Die Basalmembran ist aufgrund von Einlagerungen verschiedener Moleküle wie interstitiellem Kollagen Typ I, III und V, Laminin $\alpha 2$ und $\beta 2$ sowie Tenascin in die *Lamina reticularis* stark verdickt (62-64). Eosinophile können das Zytokin *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) produzieren, welches Fibroblasten dazu anregt, extrazelluläre Matrixproteine zu produzieren. Gleichzeitig wirkt TGF- β auf Enzyme

inhibierend, welche diese extrazelluläre Matrix wieder abbauen würden (65). Diese Zunahme in der Stärke der *Lamina reticularis* spiegelt sich im Schweregrad der Erkrankung, dem chronischen Zustand und der charakteristischen AHR wider (66, 67). Die glatte Muskulatur weist eine starke Hypertrophie sowie Hyperplasie auf und trägt ebenfalls zur AHR bei (68, 69). Mastzellen könnten bei diesem Prozess eine Rolle spielen, da sie verschiedene Mediatoren synthetisieren, die direkt auf die Atemwegsmuskelzellen wirken können. Diese Mediatoren vermitteln, dass die Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur ihren Phänotyp ändern und somit an der Einlagerung der Matrixproteine und Kollagene mitwirken. Weiterhin können sie die Konstriktion der glatten Muskulatur sowie Proliferation der Muskelzellen anregen (70). Die Proliferation der glatten Atemwegsmuskelzellen wird zusätzlich durch autokrine Signale durch TGF- β unterstützt (71). Diese Zunahme an Muskulatur findet sowohl in den kleinen als auch großen Atemwegen statt (69). Die Atemwege werden weiterhin durch Blutgefäße verdickt, da diese sowohl in der Anzahl als auch Größe bei Asthma zunehmen (Abb. 1.1) (72).

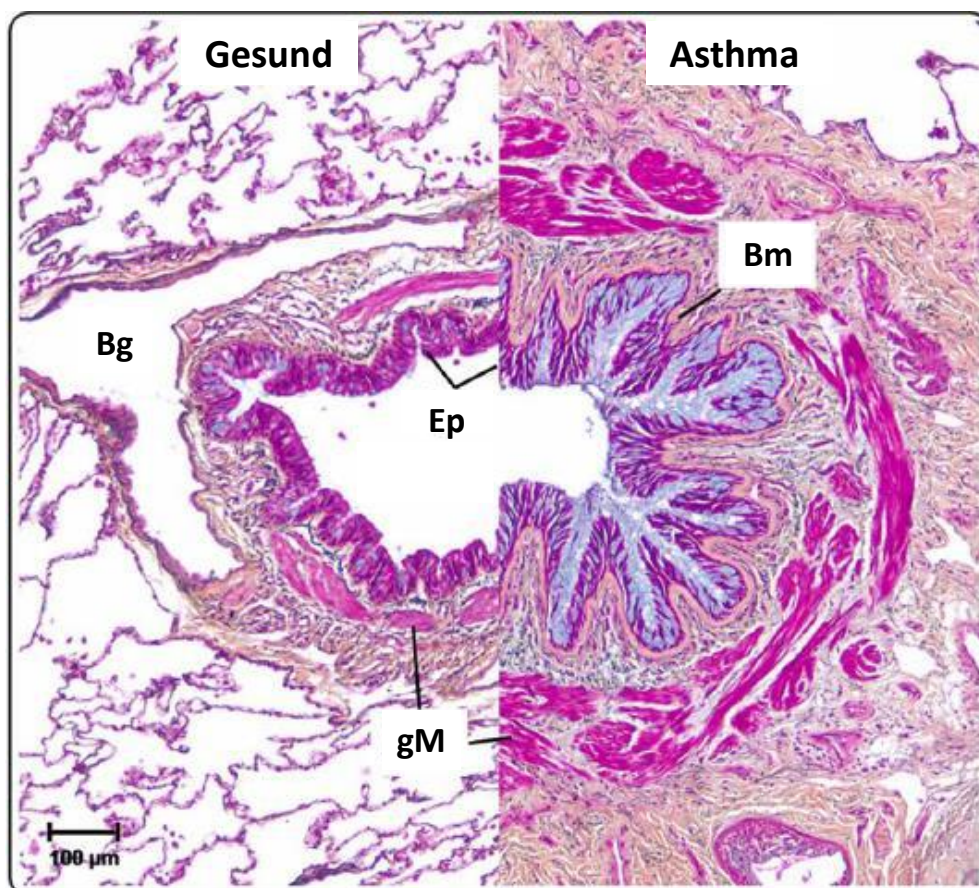


Abb. 1.1: Strukturelle Veränderungen in Atemwegen von Asthmatikern. Die Atemwege von Asthmatikern zeigen strukturelle Veränderungen, *Remodeling* genannt. Das Epithel (Ep) weist eine Becherzellhyperplasie und Mukus-Hypersekretion auf. Die Basalmembran (Bm) ist verdickt und das Volumen der glatten Muskulatur (gM) nimmt stark zu. Zusätzlich nehmen die Blutgefäße (Bg) in Anzahl und Größe zu. Abbildung geändert nach Wadsworth *et al.*, 2012 (73).

In diese Prozesse scheint der Angiogenese-fördernde vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) involviert zu sein, welcher bei Asthma in den Atemwegen vermehrt synthetisiert wird (74). Freigesetztes IL-13 wirkt zusätzlich auf die Becherzellen des Epithels, welches die Atemwege zum Lumen auskleidet. Es entsteht eine Becherzellmetaplasie mit einer Hypersekretion von Mukus, wodurch es zur weiteren Obstruktion der Atemwege kommt (Abb. 1.1) (73, 75). Zusätzlich lösen sezernierte Produkte der Eosinophilen und Mastzellen Verletzungen und Schäden am Atemwegsepithel aus, sodass dauerhafte Reparaturereignisse stattfinden. Diese scheinen bei Asthma im Epithel fehlreguliert und somit essentiell am Atemwegs-*Remodeling* beteiligt zu sein (60).

1.2 Das Atemwegsepithel

1.2.1 Der Aufbau des Atemwegsepithels

Das Atemwegsepithel bildet die Grenzschicht zwischen dem Gewebe und der Umwelt, indem es die innere Wand der Atemwege auskleidet. Es ist ein gerichteter Verband aus acht verschiedenen Zelltypen, die in drei Gruppen eingeordnet werden können: Basalzellen, kubische zilientragende Zellen und kubische sekretorische Zellen (Abb. 1.2) (76). Die Basalzellen sitzen der Basalmembran auf (77). Undifferenzierte Basalzellen können zu zilientragenden und sekretorischen Zellen differenzieren (78). Die ausdifferenzierten zilientragenden und sekretorischen Zellen reichen bis zur apikalen Seite des Epithels, sodass sie mit dem Lumen im direkten Kontakt stehen (79, 80). Die zilientragenden Zellen sind an der apikalen Seite mit circa 300 Zilien pro Zelle besetzt, welche für die mukoziliäre Clearance koordiniert bewegt werden, dem sogenannten Zilienschlag. Da diese Bewegungen mit einem hohen Energiebedarf verbunden sind, sind eine große Anzahl an Mitochondrien direkt neben den Zilien angeordnet. Zusätzlich befindet sich ein dichtes Netzwerk aus Mikrotubuli an der apikalen Seite der zilientragenden Zellen (76, 81). Bei den sekretorischen Zellen sind die Becherzellen und Clubzellen die verbreitetsten Zelltypen, wobei die Becherzellen den hauptsächlichen Anteil in den großen Atemwegen des Menschen einnehmen (76, 82). Die Clubzellen stellen die sekretorischen Zellen in den Bronchiolen dar und sind in den großen Atemwegen kaum vorhanden (80). Die Becherzellen sind durch die Produktion von Mukus

charakterisiert und enthalten dementsprechende membrangebundene Granula mit Muzinen (83).

Das aus diesen unterschiedlichen Zelltypen zusammengesetzte Atemwegsepithel bildet eine physikalische Barriere zwischen Lumen und darunterliegendem Atemwegsgewebe, indem verschiedene Zell-Zell-Kontakte zwischen den einzelnen Epithelzellen gebildet werden (Abb. 1.2) (73, 84). Die Zwischenräume zwischen den apikalen Zellen werden durch die sogenannten *Tight Junctions* abgedichtet (85). Durch diese Strukturen wird der parazelluläre Transport von Ionen, Wasser und einigen Makromolekülen reguliert und gleichzeitig die Polarität der Zellen erhalten. Die *Tight Junctions* setzen sich aus Tricellulin, Occludin und Claudinen zusammen (86). Zusätzlich sind die Zellen der apikalen Epithelschicht noch durch *Adherens Junctions* miteinander verbunden, um die Zellintegrität aufrecht zu erhalten. Diese Verknüpfung besteht aus Cadherin-Catenin-Komplexen, welche die Aktin-Zytoskelette der benachbarten Zellen miteinander verbinden (87). Über Desmosomen sind Basalzellen untereinander verbunden und stellen Verknüpfungen zwischen Basalzellen und den kubischen differenzierten Zellen her (Abb. 1.2) (77, 88). Weiterhin bilden Epithelzellen

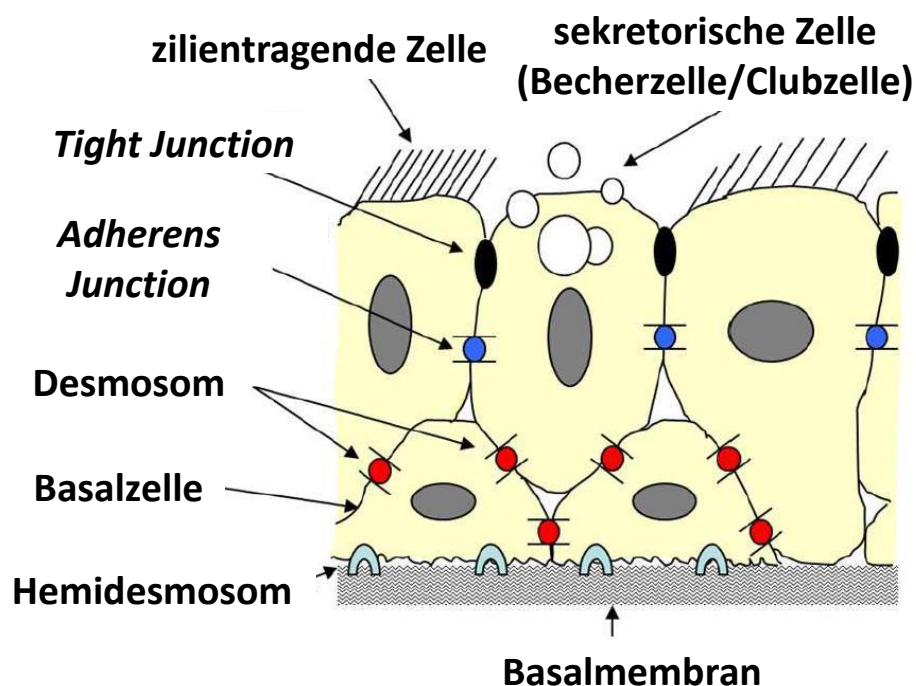


Abb. 1.2: Aufbau des humanen bronchialen Atemwegsepithels. Das Epithel besteht aus Basalzellen, zilientragenden Zellen und sekretorischen Zellen, die in Becherzellen und Clubzellen unterschieden werden können. Die Zellen sind untereinander über *Tight Junctions*, *Adherens Junctions*, Desmosomen und Hemidesmosomen miteinander und mit der Basalmembran verbunden. Abbildung geändert nach Wadsworth *et al.*, 2012 (73).

Integrin-Heterodimere wie Integrin $\alpha 6 \beta 4$, welches an Laminin-5 in der Basalmembran bindet um Verbindungen zwischen den Basalzellen und der Basalmembran herzustellen, die sogenannten Hemidesmosomen (Abb. 1.2) (89). Zwischen dem Zytoplasma benachbarter Zellen gibt es zusätzliche so genannte *Gap Junctions*, welche eine direkte Kommunikation zwischen den Zellen erlaubt (90).

1.2.2 Die Funktionen des Atemwegsepithels

Das Atemwegsepithel fungiert es vor allem als Schutzschicht und vermittelt die Kommunikation zum Gewebe und den darin enthaltenen Zellen. Neben mechanischen Schutzmechanismen sind die Epithelzellen auch in Prozesse der angeborenen Immunität involviert, sodass es eine wichtige Rolle bei obstruktiven Atemwegserkrankungen wie Asthma spielt (73, 84).

Eine wichtige Aufgabe des Atemwegsepithels ist die mukoziliäre Clearance, sprich der Abtransport von Schadstoffen aus dem Atemwegslumen. An diesen Prozessen sind Becherzellen sowie submuköse Drüsen durch die Produktion von Mukus sowie zilientragende Zellen mit dem Zilienschlag beteiligt (73). Der von sekretorischen Zellen sezernierte Mukus besteht aus hydratisierten Gel-bildenden Muzinen und enthält einige protektive Moleküle, wie Defensine, IgA, Lactoperoxidase, Katalase, Superoxid-Dismutase sowie Antioxidantien (91). Auf der apikalen Seite des Epithels bildet der Mukus eine Gelschicht, von der eingeatmete Partikel und Pathogene umschlossen und anschließend durch den Zilienschlag abtransportiert werden (84). Zusätzlich können die Becherzellen und Clubzellen bei einer Verletzung für die Wundheilung de-differenzieren und proliferieren (73, 92).

Als Bestandteil der Immunantwort exprimieren Epithelzellen verschiedenste sogenannte *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). Dazu gehören die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), NOD-ähnlichen Rezeptoren und RIG-I-ähnlichen Rezeptoren. Diese erkennen Bakterien und Viren, wodurch die Produktion verschiedener Moleküle induziert wird, sodass letztendlich immunologische Zellen rekrutiert und aktiviert werden, die in die Inflammation und adaptive Immunität involviert sind (84).

Zusätzlich sind von Epithelzellen synthetisierte und sezernierte Faktoren an der Regulierung verschiedener Immunzellen beteiligt. So produzieren Epithelzellen zum Beispiel TGF- β , ein chemotaktischer Lockstoff für die innaten lymphoiden Zellen (93). TGF- β inhibiert zusätzlich

die Proliferation von T-Lymphozyten und steigert die Differenzierung von T_{Reg}1-Zellen, welche IL-10 produzieren (94).

1.2.2 Die Rolle des Atemwegsepithels bei der Pathogenese von Asthma

Das Atemwegsepithel ist essentiell in die Pathogenese von Asthma involviert. Es zeigt morphologische Veränderungen sowie eine Fehlregulation der Barrierefunktion. Gleichzeitig ist die Immunantwort durch den Th₂-Status in Asthma-Patienten verändert, bei dessen Prozessen das Epithel mitwirkt (84). Wie bereits beschrieben, erfüllt das Epithel eine wesentliche Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von verschiedenen Immunzellen wie dendritische Zellen, Eosinophilen und Th₂-Zellen (Kap. 1.1.3).

Die Barrierefunktion des Atemwegsepithels ist durch zerstörte Zell-Zell-Verbindungen stark beeinträchtigt. Die Folge der fehlerhaften Barriere ist eine erhöhte Permeabilität, die nicht nur die Sensibilisierung erleichtert, sondern auch schneller epitheliale Schädigungen und die Th₂-Immunantwort aktiviert. Die daraufhin produzierten Th₂-Zytokine können wiederum weitere epitheliale Veränderungen verursachen (95). In Asthma-Patienten wurden keine Proteine für die *Tight junctions* mehr nachgewiesen, genauso waren die Proteine für die *Adherens Junctions* und die Länge der Desmosomen stark reduziert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die wichtigen Zelladhäsionsproteine Caveolin-1, E-Cadherin, β -Catenin und Claudin-18 im Epithel von Asthmatikern nicht mehr vorhanden waren (84). Der Verlust dieser Proteine könnte zusätzlich durch die proteolytische Aktivität von Allergenen, Pathogenen oder anderen eingeatmeten schädlichen Substanzen verursacht werden (96).

Weiterhin ist die mukoziliäre Clearance als wichtiger Abwehrmechanismus gegen Schadstoffe bei Asthma fehlreguliert. Zilientragende Zellen und Clubzellen transdifferenzieren zu Becherzellen, wodurch eine Zunahme an Becherzellen verbunden mit einer Abnahme an zilientragenden Zellen an der apikalen Seite des Epithels entsteht (96). Dieser Prozess wird durch SPDEF (*SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor*) eingeleitet, dessen Produktion durch IL-13, dem epithelialen Wachstumsfaktor EGF und Amphiregulin gesteuert wird (97-99). Zusätzlich weisen die Becherzellen eine erhöhte Expression von hauptsächlich dem Muzin MUC5AC auf (100, 101). Die Becherzellmetaplasie geht mit einer erhöhten Expression des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) und einer erhöhten Aktivität der Th₂-Zytokine IL-13 und IL-9 einher (101-103). Der mukoziliäre Abtransport von Schadstoffen ist weiterhin durch eine geringere Frequenz des Zilienschlags, einem

unkoordinierten ungerichteten Zilienschlag und einer ungerichteten fehlerhaften Anordnung der Zilien, sprich einer Fehlfunktion, gestört (104). Die Hypersekretion des Mukus und die fehlerhafte Zilienfunktion können letztendlich zum für Asthma charakteristischen Husten und zur Atemwegsobstruktion durch den sehr trockenen Mukus beitragen (105). Außerdem wird durch die starke MUC5AC-Synthese die Apoptose von Eosinophilen reduziert, sodass die Becherzellmetaplasie auch die durch Eosinophilen vermittelte Immunantwort beeinflusst (106).

Das Epithel produziert in asthmatischen Atemwegen hohe Mengen an Periostin, welches wiederum die Synthese von TGF- β verstärkt. Durch die von Periostin ausgelösten Signalwege kommt es zu einer fehlregulierten Kollagensynthese durch die Myofibroblasten und somit zu den bereits beschriebenen Ablagerungen in der Basalmembran (Kap. 1.1.4) (107).

Weiterhin scheinen Epithelzellen nicht mehr auf oxidativen Stress, der durch eingeatmete Schadstoffe ausgelöst wird, mit einer adäquaten antioxidativen Antwort reagieren zu können. Diese Antwort wird durch das Fehlen von Antioxidantien inhibiert und könnte die erhöhte Sensitivität gegenüber Allergenen und anderen Substanzen erklären (108).

1.3 Asthma-Exazerbationen

1.3.1 Auftreten, Konsequenzen und Definition der Asthma-Exazerbation

Bei chronischem Asthma kann es zu plötzlich auftretenden akuten Verschlimmerungen der Krankheit kommen, der sogenannten Asthma-Exazerbation. Solche Phasen akuter Verschlimmerungen verursachen signifikant erhöhte Kosten für das Gesundheitssystem im Vergleich zum stabilen Asthma (109, 110). Daraus resultiert für den Patienten eine verschlechterte Lebensqualität, eine sich stetig verringernde Lungenfunktion und kann in einigen Fällen sogar zum Tod führen (111-113). Eine Studie des *National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program* ergab, dass 5 % der Patienten mit mildem Asthma drei oder mehr Exazerbationen pro Jahr erlitten. Dagegen stieg der Anteil in der Gruppe der Patienten mit moderatem Asthma auf 13 % an und in der Gruppe des schwergradigem Asthmas erlitten 54 % mindestens drei Exazerbationen pro Jahr, woraus geschlossen wurde, dass wieder auftretende Exazerbationen mit der Schwere der Erkrankung

verbunden sind (114). Unabhängig von der Schwere der Asthma-Erkrankung sind Krankenhausaufenthalte ein Indikator für ein erhöhtes Risiko für weitere Exazerbationen (115).

Seit den 1990ern wurden immer wieder verschiedene Definitionen einer Asthma-Exazerbation für klinische Studien verwendet und dem Stand der Forschung entsprechend weiterentwickelt (116). Die meisten Definitionen haben jedoch zwei Aspekte gemein, sodass eine Exazerbation als eine „akute Verschlechterung der asthmatischen Erkrankung mit der Notwendigkeit der Behandlung mit systemischen Kortikosteroiden oder der Erhöhung der Dosis an systemischen Kortikosteroiden zur Vermeidung einer weiteren Verschlimmerung“ definiert werden kann (117). Die akute Verschlechterung zeigt sich in einer Kombination aus größerer Atemnot, stärkerem Husten und Giemen sowie einem erhöhten Engegefühl in der Brust und kann durch eine Messung der weiter verminderten Lungenfunktion nachgewiesen werden (117).

Exazerbationen können ebenso wie Asthma in verschiedenen Schweregraden von mild bis zu schwergradig auftreten (116, 118). Vor allem bei Exazerbationen von Patienten mit schwergradigem Asthma ist eine zeitweilige Erhöhung der Kortikosteroid-Dosis nicht ausreichend und oftmals von Einlieferungen in die Notaufnahme und Krankenhausaufenthalten begleitet (118). Heutzutage kann das Risiko, eine Asthma-Exazerbation zu erleiden, lediglich durch ein gutes Asthma-Management reduziert werden. Zu diesem Management gehört die Aufklärung des Patienten über die Erkrankung, eine regelmäßige Kontrolle der Symptome und Lungenfunktion, die Überwachung von Auslösern sowie die pharmakologische Therapie. Die frühe Erkennung und damit mögliche Intervention einer Exazerbation ist bisher kaum möglich, da die Pathogenese der Asthma-Exazerbation noch nicht vollständig verstanden ist (119).

1.3.2 Die Auslöser von Asthma-Exazerbationen

Asthma-Exazerbationen können durch den Kontakt mit verschiedenen Auslösern wie Viren, Bakterien, Allergenen oder anderen Schadstoffen in der Luft ausgelöst werden (120). Viren sind allerdings der Hauptauslöser für exazerbiertes Asthma. 80-85 % der akuten Exazerbationen im Kindesalter gehen auf virale Infektionen des Atemtraktes zurück (121). Im Erwachsenenalter wurde bei 57 % der Exazerbationen eine virale Infektion nachgewiesen (122).

Es wurden bisher respiratorische Viren wie humane Rhinoviren (hRV), RSV, Influenzaviren, Coronaviren, humane Metapneumoviren, Parainfluenzaviren, Adenoviren und Bocaviren in Asthma-Exazerbationen nachgewiesen (123, 124). Das hRV ist mit 60 % einer der Hauptauslöser einer virus-induzierten Exazerbation in Erwachsenen und auch in Kindern der prominenteste Trigger (121, 122, 125). Adenoviren dagegen lösen nur 7 % der virus-assoziierten Exazerbationen aus und Influenzaviren lediglich 1-9 % (126). Influenza A-induzierte Exazerbationen sind jedoch meist schwergradig und mit einer Reduzierung der FEV₁ um mehr als 50 % verbunden (127).

Das Bakterium *Mycoplasma pneumoniae* verursacht akute Atemwegsinfektionen bei Kindern und Erwachsenen und kann somit eine Exazerbation induzieren (120). Ein weiterer bakterieller Auslöser für Asthma-Exazerbationen bei Kindern und Erwachsenen ist *Chlamydia pneumoniae* (128, 129).

Andere Auslöser für Asthma-Exazerbationen sind Schadstoffe freigesetzt durch zum Beispiel Rauchen sowie Ozon, Feinstaub oder Stoffe, mit denen der Erkrankte während der Arbeitsabläufe in Kontakt kommt wie Chemikalien, Reinigungsmittel und Tiere sowie Stress, Übergewicht, Anstrengung, Medikamente und Hormone (120, 130). Zusätzlich können sich Alter und Geschlecht auf das Auftreten einer Asthma-Exazerbation auswirken. So treten Exazerbationen im Kindesalter öfter bei männlichen Erkrankten auf, während im Erwachsenenalter Frauen eine höhere Prävalenz für Asthma-Exazerbationen zeigen (131).

1.3.3 Der Verlauf einer virus-induzierten Asthma-Exazerbation

Infektionen durch Viren lösen in gesunden Atemwegen eine typische Th₁-vermittelte antivirale Immunantwort aus. Durch die Th₂-geprägte chronische Inflammation bei Asthma, scheint die normale antivirale Th₁-Immunantwort unterdrückt zu sein (123). Somit könnte eine Verschiebung der Balance zwischen den Zytokinen der Th₁-vermittelten und Th₂-assoziierten Immunantwort ein bestimmender Faktor für die Schwere der Asthma-Exazerbation sein (130).

Bisher sind die genauen Mechanismen, vor allem der frühen Phase, einer Asthma-Exazerbation noch nicht genau verstanden. Ein Großteil des Wissens über die Rolle der Viren im akuten Asthma wurde durch die Analyse der Mechanismen der viralen Infektion an sich gewonnen (130). Gelangt ein Virus in die Atemwege, trifft es zunächst auf das Atemwegsepithel, welches bei Asthma bereits eine gestörte Barrierefunktion aufweist (84).

Diese kann durch die zytotoxische Wirkung von zum Beispiel hRV und die Auftrennung der Proteininteraktionen der *Tight Junctions* weiter verstärkt werden (132). Die meisten Serotypen der Rhinoviren binden an die Epithelzellen über das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1). Rhinoviren können die Expression von ICAM-1 hochregulieren, wodurch mehr Rezeptoren für die Infektion zur Verfügung stehen und diese somit begünstigt wird (133, 134). Viren sind durch sogenannte *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) charakterisiert, welche durch PRRs, wie den TLRs und RNA-Helikasen RIG-I und MDA5, erkannt werden (132). Doppelsträngige virale RNA, die bei der Replikation des hRV entsteht, wird in den infizierten Epithelzellen durch TLR3 erkannt (135). TLR3 ist ein Typ 1 integrales Membran-Glykoprotein und in den Endosomen der Epithelzellen lokalisiert. Zusätzlich kann das *Melanoma Differentiation-Associated Gene 5* (MDA5) im Zytosol Rhinoviren erkennen (132). Durch die Bindung an die PRRs wird die Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren für die Einleitung der antiviralen Antwort und die Synthese von Muzinen induziert (123). Die Induktion der Synthese von MUC5AC in den Epithelzellen erfolgt über eine Kaskade verschiedener Signale. Nach der Erkennung der viralen dsRNA durch TLR3 wird durch die Induktion von Matrixmetalloproteinasen TGF- α freigesetzt (136). Die Induktion der Matrixmetalloproteinasen ist dabei vom nuklearen Faktor NF- κ B abhängig. TGF- α aktiviert schlussendlich die Aktivierung des MUC5AC-Promotors über EGFR-abhängige Signalwege (136). Die pro-inflammatorischen Mediatoren, die von den Epithelzellen und auch anderen inflammatorischen Zellen während der Asthma-Exazerbation synthetisiert werden, sind Eotaxin-1 und -2, IL-6, IL-8, IL-16, RANTES, GM-CSF und verschiedene Angiogenese-vermittelnde Wachstumsfaktoren (134, 137, 138). IL-6 ist ein Mediator für die akute inflammatorische Antwort (134). IL-8 dagegen ist ein wichtiger chemotaktischer Lockstoff für Neutrophile und sowohl in nasalen Sekreten, Sputum und der BAL während einer Asthma-Exazerbation in erhöhter Menge nachweisbar (123, 139-141). Durch die erhöhte Produktion von GM-CSF können Eosinophile rekrutiert werden (142), aber GM-CSF kann auch die Freilassung von Neutrophilen aus dem Knochenmark veranlassen (143). Während der Exazerbation ist zusätzlich eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen und dessen Produkt ECP nachweisbar. Diese Prozesse werden durch den chemotaktischen Lockstoff und Aktivator RANTES vermittelt (123, 144). So ist die virus-induzierte Exazerbation vor allem durch die Infiltration von Neutrophilen und teilweise durch die Degranulation der Eosinophilen charakterisiert (120). Durch die Infiltration und Aktivierung der Neutrophilen wird unter anderem die Atemwegsobstruktion durch die Mukus-Sekretion induziert (134). Das von den

Epithelzellen synthetisierte IL-16 ist vor allem bei der hRV-vermittelten Entzündung ein wichtiger Mediator, da es als chemotaktischer Lockstoff für Lymphozyten, Makrophagen und Eosinophilen wirkt und diese zusätzlich aktiviert (145).

Zusätzlich scheint die antivirale Interferon-vermittelte Antwort in den asthmatischen Atemwegen fehlreguliert zu sein, wodurch die Infektion länger anhält (120). So können Rhinoviren an den Rezeptor MDA5 binden und somit dessen Aktivität und letztendlich die Interferonsynthese verhindern. Durch die fehlende Synthese von Interferonen, werden gleichzeitig antivirale Mechanismen wie die Induktion von Interferon-induzierten Genen und die Rekrutierung einiger inflammatorischer Zellen verhindert (132). Interferon (IFN)- β wird normalerweise bei einer Infektion mit hRV hochreguliert, wodurch eine erhöhte Apoptose der Epithelzellen stattfindet, sodass die virale Replikation verhindert wird. Diese Mechanismen scheinen bei der Exazerbation nicht induziert zu werden, da IFN- β fehlt (146). Zusätzlich ist die Produktion von IFN- λ während der Exazerbation inhibiert, was mit einer Verstärkung der Symptome und einer verminderten Lungenfunktion korreliert (147). Dies wird durch IL-13 verursacht, welches die Produktion von IFN- λ in den Atemwegsepithelzellen unterdrückt (148). Die unterdrückte Interferon-Antwort während der Asthma-Exazerbation könnte aber auch durch erhöhte Level an TGF- β entstehen, indem dieses den Interferon-regulierenden Faktor 3 (IRF3) und damit einen wichtigen Teil des Interferon-induzierenden TLR3-Signalweges reguliert (149). Die Induktion der Synthese von TGF- β ist dabei auf Epithelzellen als Quelle zurückzuführen (150).

Ein weiteres Problem einer virus-induzierten Asthma-Exazerbation ist die Koinfektion mit Bakterien. Viren können die mukoziliäre Clearance, die bei Asthma grundsätzlich beeinträchtigt ist, weiter verschlechtern. Als Folge davon können Bakterien an die Muzine binden und das Atemwegsepithel besiedeln. Dies wird zusätzlich durch eine verminderte Penetration von Immunzellen und antibakteriellen Substanzen im Mukus erleichtert (151). Außerdem könnte durch die Viren ausgelöster Zelltod neue Rezeptoren für die Bindung von Bakterien freilegen (152).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Asthma und vor allem Asthma-Exazerbationen sind ein weltweites Problem, das aufgrund von steigenden Prävalenzen an Priorität gewinnt (3). Zum einen verursachen Exazerbationen hohe Kosten für die Gesundheitssysteme und zum anderen sinkt die Lebensqualität der Betroffenen durch immer wiederkehrende Krankenhausaufenthalte und Einschränkungen im Alltag (109-113). Auch wenn die aktuelle Forschung bereits die Auslöser und einige Mechanismen der Asthma-Exazerbation untersucht und wichtige Aspekte aufgeklärt hat, bleibt die Exazerbation zum großen Teil noch unverstanden. Dementsprechend kann eine Asthma-Exazerbation heutzutage erst beim Auftreten der Symptome erkannt und behandelt werden, wodurch jedoch die daraus folgenden Verschlimmerungen des Asthmas nicht verhindert werden können. Für eine Steigerung der Lebensqualität und das Abwenden der aus der Exazerbation folgenden Konsequenzen für den Patienten wäre eine frühzeitige Erkennung und damit verbundene frühzeitige Behandlung essentiell. Da das Atemwegsepithel den ersten Kontakt mit Pathogenen während der Exazerbation darstellt und wichtige Funktionen während der asthmatischen Erkrankung, aber auch Exazerbation, übernimmt, war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Etablierung eines *in vitro*-Zellkulturmodells zur Untersuchung der epithelialen Mechanismen der frühen Phase einer Asthma-Exazerbation.

Für die Untersuchung der epithelialen Mechanismen der frühen Phase der Asthma-Exazerbation sollte zunächst ein *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation mit primären humanen Bronchialepithelzellen etabliert und charakterisiert werden. Dazu sollte ein 3D-Air liquid Interface-Zellkulturmodell mit sowohl lungen-gesunden humanen Bronchialepithelzellen als auch Zellen von Asthma-Patienten entwickelt werden. Im nächsten Schritt sollte dieses Modell zur Ausbildung eines Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyps weiterentwickelt werden. Da Viren den größten Anteil an Exazerbationen in Asthma auslösen, sollte anschließend die frühe antivirale Inflammation der Exazerbation durch die Gabe eines viralen Surrogates, Poly(I:C), etabliert und charakterisiert werden.

Für weitere Untersuchungen der Mechanismen der frühen Phase einer Asthma-Exazerbation mithilfe dieses *in vitro*-Zellkulturmodells sollten Genexpressionsanalysen durchgeführt werden, mit deren Hilfe potentielle Biomarker für die frühzeitige Erkennung einer Asthma-Exazerbation identifiziert und charakterisiert werden sollten.

2 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind in den folgenden Kapiteln und Tabellen (Tab. 2.1 bis Tab. 2.6) aufgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden die Reagenzien und Chemikalien entsprechend der Herstellerangaben angesetzt und gelagert.

2.1 Allgemeine Reagenzien und Chemikalien

Folgende allgemeinen Laborchemikalien wurden verwendet (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.

	Hersteller
Agar-Agar (Bio-Science-Grade, granuliert)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
LE Agarose	7Bioscience, Hartheim, DE
β -Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim, DE
DAB (3,3'-Diaminobenzidine)	Sigma, Steinheim, DE
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	Sigma, Steinheim, DE
Entellan	Merck, Darmstadt, DE
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol	Merck, Darmstadt, DE
Ethidiumbromid	Invitrogen, Carlsbad, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
4% Formaldehydlösung (Histofix)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hämatoxylin (Hämalaun nach Mayer)	Merck, Darmstadt, DE
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
NaOH-Plättchen (Natriumhydroxid Plättchen)	Merck, Darmstadt, DE
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Paraffin (Paraplast Plus)	Leica, Nussloch, DE
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung; Roti-Cell 10x)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Perjodsäure	Merck, Darmstadt, DE
HCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Schiffssches Reagenz	Merck, Darmstadt, DE
Tween20	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tri-Na-Citrat-Dihydrat	MP Biomedicals, Eschwege, DE
TRIS (Tris(hydroxymethylaminomethan), Trizma base)	Sigma, Steinheim, DE
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, DE
Xylol	VWR, Darmstadt, DE

2.2 Puffer

Die Puffer wurden den folgenden Anleitungen entsprechend angesetzt und verdünnt. Zum Einstellen des pH-Wertes wurden 2 N sowie 4 N Salzsäure beziehungsweise Natriumhydroxid-Plätzchen verwendet.

Citratpuffer:

100 nM Stammlösung:

29,41 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat, ad 1 l ddH₂O

10 nM Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung, 900 ml ddH₂O

pH 6,0 mit HCl einstellen

DEPC-H₂O:

100 µl DEPC, ad 1 l ddH₂O

über Nacht rühren, autoklavieren

Magermilchlösung (2 %):

2 g Magermilch in 100 ml PBS

Na₂EDTA (0,5 M):

186,12 g Na₂EDTA-2H₂O in 800 ml DEPC-H₂O lösen, rühren

pH 8,0 mit NaOH-Plätzchen einstellen

ad 1 l DEPC-H₂O

TAE-Puffer:

50-fach Stammlösung:

242 g TRIS in 500 ml DEPC-Wasser

+ 100 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0)

ad 1 l ddH₂O

1-fach Gebrauchslösung:

20 ml Stammlösung, 980 ml ddH₂O

TBS-Puffer:

10-fach Stammlösung:

53 g NaCl, 12 g TRIS, ad 1 l ddH₂O

	<u>1-fach Gebrauchslösung:</u> 100 ml Stammlösung, 900 ml ddH ₂ O pH 7,4 mit HCl einstellen
<u>TRIS-EDTA-Puffer:</u>	<u>10-fach Stammlösung:</u> 12,1 g TRIS, 3,7 g EDTA, ad 1 l ddH ₂ O pH 9,0 mit HCl einstellen <u>1-fach Gebrauchslösung:</u> 100 ml Stammlösung, 900 ml ddH ₂ O pH 9,0 mit HCl einstellen 500 µl Tween20 hinzugeben
<u>TRIS-HCl-Puffer:</u>	<u>Stammlösung (0,5 M TRIS):</u> 60,57 g TRIS in 500 ml ddH ₂ O lösen pH 7,4 mit HCl einstellen ad 1 l ddH ₂ O <u>Gebrauchslösung (0,05 M TRIS):</u> 100 ml Stammlösung, 900 ml ddH ₂ O pH 7,4 mit HCl einstellen

2.3 Zellkulturmedien und Stimulantien

Für die Kultivierung der humanen Bronchialepithelzellen wurden das Proliferationsmedium *Bronchial Epithelial Cell Growth Medium* (BEGM) und das Differenzierungsmedium *PneumaCult ALI-Medium* verwendet. Beide Zellkulturmedien wurden entsprechend der Herstellerangaben angesetzt und gelagert. Dem Differenzierungsmedium wurde zusätzlich noch Penicillin/Streptomycin (1-fach) als Antibiotikum zugesetzt.

Das rekombinante humane Interleukin-13 (rhIL-13) und Polyinosin:Polycytidyläure (Poly(I:C)) wurden in PBS steril angesetzt und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Tab. 2.2: Zellkulturmedien, Reagenzien für die Zellkultur und eingesetzte Stimulantien.

	Hersteller
BEGM Bullet Kit	Lonza, Basel, CH
Collagen IV aus der humanen Plazenta (5 mg)	Sigma, Steinheim, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories, Paschingen, AUT
HBSS (Salzlösung nach Hanks, ohne Mg^{2+} , ohne Ca^{2+})	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
0,2 % Heparin Salt Solution in PBS (2 mg/ml)	Stemcell, Vancouver, CAN
Hydrocortison (100 mg, Pulver)	Stemcell, Vancouver, CAN
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung; Roti-Cell 10x PBS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Pen/Strept (1000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin)	Sigma, Steinheim, DE
PneumaCult ALI-Medium	Stemcell, Vancouver, CAN
Poly(I:C)	Sigma, Steinheim, DE
ReagentPack Subculture Reagents	Lonza, Basel, CH
rhIL-13	Peprtech, Rocky Hill, USA

2.4 Oligonukleotide

Für die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) wurden kleine Oligonukleotide (Primer) von der Firma Eurofins (Ebersberg, DE) synthetisiert (Tab. 2.3). Vor Gebrauch wurden sie in DEPC-Wasser verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 100 pmol/ μ l entstand und bei -20°C gelagert.

Tab. 2.3: Primersequenzen für die qRT-PCR.

Gen	RefSeq ID	Sequenz (5'→ 3')	Amplikon
CC-10	NM_003357.4	for CCAGACTCAGAGACGGAACC rev AGATCTCTGCAGAAGCGGA	122 bp
CCL26	NM_006072.4	for CCTGGGTGCGAAGCTATGAA rev ACTCTGGGAGGAAACACCCT	282 bp
CK-5	NM_000424.3	for ATGTCAAGAAACAGTGCGCC rev CCAGAGGAAACACTGCTTGTG	298 bp

				2 Material
FoxJ1	NM_001454.3	for rev	TCGTATGCCACGCTCATCTG CGGATTGAATTCTGCCAGGT	137 bp
IL-8	NM_000584.2	for rev	TGTGAAGGTGCAGTTTTGCCAAGG GTTGGCGCAGTGTGGTCCACTC	132 bp
IP-10	NM_001565.3	for rev	CCACGTGTTGAGATCATTGCT TGCATCGATTTTGCTCCCCT	152 bp
MUC5AC	NM_001304359.3	for rev	GCCTTCACTGTACTGGCTGAG AGGGTCTGAAGATGGTGACG	259 bp
RPL-32	NM_000994.3	for rev	CATCTCCTTCTCGGCATCAT TAACCAATGTTGGGCATCAA	197 bp
TNF- α	NM_000594.3	for rev	TCCCCAGGGACCTCTCTCTA GAGGGTTTGCTACAACATGGG	102 bp

Zusätzlich wurden kommerzielle Primer der Firma Qiagen (Hilden, DE) verwendet (Tab. 2.4). Diese wurden entsprechend der Herstellerangaben gelöst und anschließend bei -20°C eingefroren.

Tab. 2.4: Quantitect Primer Assays für die qRT-PCR.

Gen	RefSeq ID	Katalognummer	Amplikon
CLCA1	NM_001285	QT01666889	139 bp
DDX58	NM_014314	QT00040509	114 bp
IFIH1	NM_022168	QT0033789	170 bp
IFN- β	NM_002176	QT00203763	120 bp
IFN- λ 1	NM_172140	QT00222495	68 bp
IL-6	NM_000600 XM_005249745	QT00083720	107 bp
SerpinB2	NM_001143818	QT02408280	132 bp
TLR3	NM_003265	QT00007714	90 bp

2.5 Molekulare Gewichtsmarker und Ladepuffer

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden der molekulare Gewichtsmarker *GeneRuler 50 bp DNA Ladder* (Thermo Scientific, Waltham, USA) und der 6-fach DNA Ladepuffer *DNA Ladder (6x)* (Thermo Scientific, Waltham, USA) verwendet.

2.6 Normalseren und Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden folgende primäre und sekundäre Antikörper (Tab. 2.5) verwendet.

Tab. 2.5: Normalseren, primäre und sekundäre Antikörper.

Normalserum		eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Ziege		1 : 10	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Pferd		1 : 10	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Primäre Antikörper		eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Anti-MUC5AC (biotinyliert)	ab79082	1 : 100	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CK-5	ab52635	1 : 1000	Abcam, Cambridge, USA
Anti-acetyliertes α -Tubulin	ab24610	1 : 1000	Abcam, Cambridge, USA

Sekundäre Antikörper		eingesetzte Verdünnung	Hersteller
biotinylated goat-anti-rabbit IgG (H+L)		1 : 100	Vector Laboratories, Burlingame, USA
biotinylated horse-anti-mouse IgG (H+L)		1 : 100	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.7 Kits

Tab. 2.6: Verwendete kommerzielle Kits.

	Hersteller
LightCycler 480 SYBR Green Master	Roche, Mannheim, DE
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
RNase-Free DNase Set (1500 Kunitz units)	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
Vectastain Elite ABC Peroxidase Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.8 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.7: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

	Hersteller
12-Well-Platten (unbeschichtet, flat bottom, nonpyrogenic, polystyrene)	Corning Inc., Corning, USA
12-Well-Platten mit Einsätzen (Porengröße 0,4 µm, Polyester)	Corning Inc., Corning, USA
CryoPure Gefäß 1,6 ml weiß	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Deckgläschen	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Einbett-Kassetten (MicroStar III Histokassetten)	VWR, Darmstadt, DE
LightCycler 480 Multiwell Plates 96, weiß	Roche, Mannheim, DE
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen 1250 µl	NerbePlus, Winsen, DE
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
RNase-/DNase-freie Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, np Safelock-Cap)	NerbePlus, Winsen, DE
Reaktionsröhren (5 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Skalpell	Schreiber, Fridingen, DE
Stabpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Inc., Corning, USA
Zellkulturflaschen (T25)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellschaber (Klingenbreite 18 ml, aus HDPE)	Greiner BioOne, Frickenhausen, DE

2.9 Geräte

Tab. 2.8: Verwendete Geräte.

	Hersteller
Autotechnikon	Thermo Scientific, Waltham, USA
Brutschrank Heracell 150	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Elektrophoresekammer	PeqLab Biotechnologies, Erlangen, DE
Gel-Dokumentationsstation	Intas, Göttingen, DE
Kühlplatte Microm AP280-1	Microm, Walldorf, DE

LightCycler 480 II	Roche, Mannheim, DE
Mikroskop Leica DMIL LED	Leica, Wetzlar, DE
Mikroskop U-DO3	Olympus, Shinjuku, JPN
Mikrotom HM355 S	Microm, Walldorf, DE
Nanophotometer	Implen, München, DE
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda Königshofen, DE
pH-Meter 766 Calimetric	Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin, DE
Reinstwasseranlage Arium Pro VF	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Sequenzkammer mit Shandon Coverplates	Thermo Scientific, Waltham, USA
Spannungsquelle PowerPac Basic	BioRad, München, DE
Sicherheitswerkbank Scanlaf Mars Safety Class 2	Weiss Labortechnik, Heroldsberg, DE
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, DE
Wasserbad Lauda A100	Lauda, Lauda Königshofen, DE
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, DE

2.10 Programme und Websites

Tab. 2.9: Verwendete Computerprogramme und Websites.

Software	Hersteller
Computerassisted stereology tool box (newCAST)	Visiopharm, Hoersholm, DK
GraphPad Prism 7 Software	De Novo Software, Los Angeles, USA
Olympus cell^A Software	Olympus, Shinjuku, JPN
LightCycler 480 Software	Roche, Mannheim, DE
Intas GDS	Intas, Göttingen, DE
Websites	
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
STRING by the String Consortium 2018	https://string-db.org/

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Humane Bronchialepithelzellen

Die *in vitro* Zellkulturexperimente wurden ausschließlich mit primären humanen Bronchialepithelzellen (HBECs) der Firma Lonza (Basel, CH) durchgeführt. Es handelte sich dabei um Zellen, welche aus der epithelialen Auskleidung oberhalb der Verzweigung der Lungen stammten. Die Zellen wurden aus dem Gewebe von sowohl lungen-gesunden Spendern, sogenannten normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBEs), als auch Spendern mit diagnostiziertem Asthma isoliert. Für die Gruppe der NHBEs wurden fünf Spender mit kaukasischer Herkunft ausgewählt, die nicht geraucht hatten. Als einzige weitere Information wurde von Lonza angegeben, ob die Spender generell Alkohol konsumiert hatten. Falls möglich wurden Spendern ausgewählt, die keinen Alkohol getrunken hatten. Jedoch war dieser Aspekt aufgrund der geringen Anzahl an zur Verfügung stehenden NHBEs bei zwei Spendern nicht als Ausschlusskriterium möglich (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Detaillierte Informationen zu den Spendern der NHBEs. Jeder Spender erhielt eine spezifische Identifikationsnummer (Lot.) unter der die Informationen zu Ethnie (C = Kaukasier), Alter, Geschlecht (M = männlich, F = weiblich), Rauchverhalten und Alkoholkonsum des jeweiligen Spenders hinterlegt wurden.

Lot.	Ethnie	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Raucher	Alkohol konsumiert
N312626	C	13	M	Nein	Nein
N326160	C	49	F	Nein	Nein
N348757	C	75	M	Nein	Nein
N382850	C	60	F	Nein	Ja
N543643	C	57	F	Nein	Ja

Zusätzlich wurden HBECs von fünf Spendern mit der Diagnose Asthma, den *diseased human bronchial epithelial cells* (DHBECs), für diese Arbeit verwendet. Für die Auswahl der DHBECs wurden die gleichen Kriterien wie bei den NHBEs angewandt. Aufgrund der geringen Anzahl an zur Verfügung stehenden DHBECs, war ein Spender jedoch Raucher (Tab. 3.2 As470633). Für die Gruppe der DHBECs wurden von Lonza im Gegensatz zu den NHBEs zusätzliche

Informationen zur Verfügung gestellt. Diese Informationen betrafen die eingenommenen Medikamente bezüglich der Asthma-Erkrankung, den Zeitpunkt der Diagnose, ob der Tod des Spenders mit der Asthma-Erkrankung in Verbindung stand und einige spenderspezifische Informationen (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Detaillierte Informationen zu den Spendern der DHBECs. Jeder Spender der DHBECs trägt eine spezifische Identifikationsnummer (Lot.). **A)** Weitere Informationen wie Ethnie (C = Kaukasier), Alter, Geschlecht (M = männlich, F = weiblich), Rauchverhalten und Alkoholkonsum wurden von Lonza (Basel, CH) zur Verfügung gestellt. **B)** Darüber hinaus wurden Angaben zur Diagnose, Einnahme notwendiger Asthma-assoziiierter Medikamente und die Todesursache von Lonza mitgeteilt.

A)

Lot.	Ethnie	Alter (in Jahren)	Geschlecht	Raucher	Alkohol konsumiert
As419243	C	62	F	Nein	Nein
As470633	C	69	M	Ja (mit 24 Jahren aufgehört)	Ja
As534647	C	55	F	Nein	Nein
As587333	C	54	M	Nein	Nein
As600506	C	44	F	Nein	Ja

B)

Lot.	Medikamente	Diagnose (Jahre vor Tod)	Tod in Verbindung mit Asthma	zusätzliche Kommentare
As419243	ProAir	2	Ja	Asthma-Attacke
As470633	Atrovent, Flonase	20	Nein	6 Tage vor dem Tod Hämoptyse, persistenten Husten seit 20 Jahren
As534647	Inhalator	20	Nein	-
As587333	Albuterol, Inhalator	Kleinkindalter	Ja	Gras- und Schimmelallergien
As600506	Advair, Albuterol, Ventolin	2	Nein	Allergisches Asthma

3.1.2 Kultivierung und Passagieren von humanen Bronchialepithelzellen

Bei den HBECs handelte es sich um adhärenente Primärzellen, welche bei 37°C und 5 % CO₂ unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Die kryokonservierten Zellen wurden bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut, im Proliferationsmedium BEGM resuspendiert und anschließend mit einer Zelldichte von 3.300 bis 3.500 Zellen pro cm² in eine T25-Zellkulturflasche gegeben. Die Zellsuspension wurde auf ein Gesamtvolumen von 5 ml pro Flasche mit BEGM aufgefüllt. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium abgenommen und gegen neues Proliferationsmedium getauscht. Am dritten Tag wurde das Volumen des Proliferationsmediums auf 8 ml pro T25-Zellkulturflasche erhöht. Danach wurde das Zellkulturmedium jeden zweiten Tag durch frisches Proliferationsmedium ersetzt.

Die HBECs wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % unter submersen Bedingungen kultiviert. Dann wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit 5 ml HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA gelöst (3 min, 37°C). Das Trypsin wurde daraufhin mit 4 ml TNS-Lösung neutralisiert und die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Boden der T25-Flasche wurde mit 2 ml HBSS gespült und die restlichen Zellen in das Reaktionsgefäß überführt. Nachdem zentrifugiert worden war (5 min, 220 x g, RT), wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Proliferationsmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension auf die Zählkammerfläche pipettiert und zwei 4x4-Quadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergab sich mit folgender Rechnung:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Anzahl gezählte Zellen}/2) * 10^4/\text{ml}$$

Die Zellen wurden anschließend abhängig von der Passagennummer entweder zur Lagerung kryokonserviert (Kap. 3.1.3) oder für *Air-liquid Interface*-Experimente auf Transwell-Inserts (Kap. 3.1.4) ausgesät (Abb. 3.1).

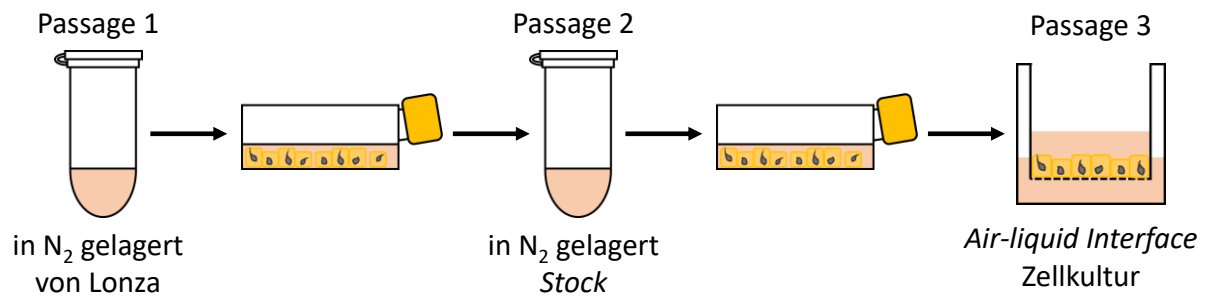


Abb. 3.1: Darstellung der verschiedenen Passagen während der Kultivierung humaner Bronchialepithelzellen. Kommerziell erhältliche HBECs von Lonza (Basel, CH) (Passage 1) wurden unter submersen Bedingungen kultiviert und in flüssigem Stickstoff gelagert (Passage 2). Für Experimente wurden Zellen der Passage 2 zunächst unter submersen Bedingungen kultiviert und anschließend auf Transwell-Filter ausgesät (Passage 3).

3.1.3 Kryokonservierung von humanen Bronchialepithelzellen

Sobald die Zellen der Passage 1 eine Konfluenz von 80 % in den T25-Flaschen erreicht hatten, wurden die Zellen abgelöst (Abb. 3.1, Kap. 3.1.2). Anschließend wurde mit dem Einfriermedium (BEGM, 20 % FCS und 10 % DMSO) eine Zellzahl von 0,5 Mio Zellen/ml eingestellt. Jeweils 500 µl der Zellsuspension wurden in ein Kryoreaktionsgefäß gegeben und anschließend bei -80°C in einem Gefrierbehälter mit einer Kühlrate von -1°C/min konserviert. Nach drei Tagen wurden die Kryoreaktionsgefäße zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.1.4 Air-liquid Interface-Zellkultur

Primäre humane Bronchialepithelzellen können *in vitro* unter sogenannten *Air-liquid Interface* (ALI)-Bedingungen zu einem pseudostratifizierten Epithel differenzieren (153).

Für die ALI-Experimente wurden ausschließlich 12-Transwell-Platten mit passenden Transwell-Filtereinsätzen verwendet, welche mit Kollagen-IV aus der humanen Plazenta beschichtet wurden. Dazu wurde Kollagen IV-Pulver aus der menschlichen Plazenta in 0,5 M Essigsäure für 1 h bei 4°C gelöst (Endkonzentration 1 mg/ml). Zum Beschichten wurde mit PBS eine Konzentration von 50 µg/ml Kollagen eingestellt und anschließend von dieser Lösung jeweils 200 µl auf die apikale Oberfläche der Filtermembranen gegeben. Die Kollagen-IV-Lösung wurde nach 3 h (RT) wieder abgenommen und die Platten für 30 min mit geöffnetem Deckel im sterilen Umfeld getrocknet. Die beschichteten Transwell-Einsätze wurden entweder

direkt benutzt oder bei 4°C gelagert. Direkt vor dem Gebrauch wurden die beschichteten Transwell-Filterflächen einmal mit 500 µl HBSS apikal gewaschen.

Für die ALI-Zellkultur wurden kryokonservierte Zellen der Passage 2 unter submersen Bedingungen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert (Abb. 3.1, Kap. 3.1.2), mithilfe von Trypsin abgelöst und 85.000-90.000 Zellen (in 500 µl BEGM) auf die beschichtete Fläche der Einsätze ausgesät. Basal wurden die Zellen mit 1 ml Proliferationsmedium versorgt.

Die Konfluenz wurden anschließend täglich visuell mit einem Stereomikroskop untersucht. Wenn die Zellschicht komplett konfluent war (nach circa zwei Tagen), wurde der sogenannte *Airlift* durchgeführt. Dazu wurde das apikale und basale Proliferationsmedium abgenommen und verworfen. In die basale Kammer des Transwells wurde 1 ml des Differenzierungsmediums PneumaCult ALI-Medium gegeben, während in die apikale Kammer der Einsätze kein Medium gegeben wurde, sodass die Zellen in direktem Kontakt mit der Umgebungsluft standen. Die Zellen wurden unter diesen *Air-liquid Interface*-Bedingungen bei 37°C und 5 % CO₂ für 28 Tage kultiviert (Abb. 3.2). An jedem zweiten Tag wurde das basale Differenzierungsmedium durch frisches PneumaCult ALI-Medium ersetzt. Zusätzlich wurde ab Tag 14 einmal die Woche apikal mit 500 µl HBSS gewaschen um abgegebenen Mukus zu entfernen.

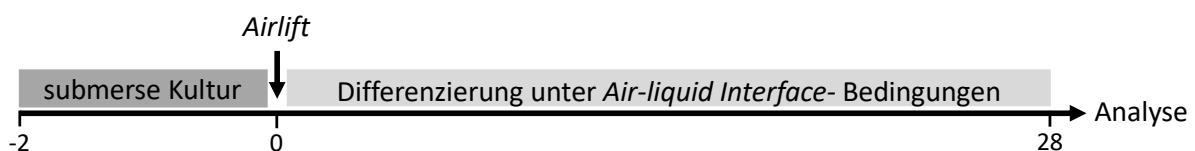


Abb. 3.2: Air-liquid Interface-Zellkulturmodell. Sobald die HBECs auf den Kollagen-IV-beschichteten Transwell-Einsatzmembranen konfluent waren, wurde der *Airlift* durchgeführt und die Zellen anschließend für 28 Tagen unter *Air-liquid interface*-Bedingung zur Ausbildung ein pseudostratifizierten ALI-Epithels kultiviert. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml PneumaCult ALI-Medium in der basalen Vertiefung versorgt.

3.1.5 Stimulation von ALI-Kulturen

Um in ALI-Zellkulturen *in vitro* einen Th₂-polarisierten Phänotyp des Atemwegsepithels zu induzieren, wurden die Zellen mit rhIL-13 behandelt. Dazu wurde von Tag 21 bis zum Ende der Differenzierung an Tag 28 dem PneumaCult ALI-Medium, das basal appliziert wurde, rhIL-13 in unterschiedlichen Konzentrationen (Endkonzentration: 1 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml rhIL-13) beigelegt (Abb. 3.3 A). Das mit rhIL-13 supplementierte Differenzierungsmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Poly(I:C) ist ein virales Surrogat, welches zur Induktion einer antiviralen Entzündungsreaktion eingesetzt wurde. Dieses wurde dem Differenzierungsmedium zugesetzt und insgesamt 1 ml davon in die basale Kammer der Transwells der ALI-Kultur gegeben. Es wurden verschiedene Konzentrationen (Endkonzentration: 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml Poly(I:C)) eingesetzt und diese an verschiedenen Zeitpunkten vor der Ernte an Tag 28 (1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h) appliziert (Abb. 3.3 B).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation. Für dieses Exazerbationsmodell wurden die Stimulationen mit rhIL-13 und Poly(I:C) kombiniert. Dafür wurden die Zellen, wie beschrieben, von Tag 21 bis Tag 28 mit 2,5 ng/ml rhIL-13 beziehungsweise 5 ng/ml rhIL-13 behandelt. Bei der Kostimulation wurden an Tag 28 sowohl rhIL-13 als auch Poly(I:C) zusammen mit dem Differenzierungsmedium in die basale Kammer gegeben und die ALI-Kulturen für 3 h mit beiden Stimulantien inkubiert. Poly(I:C) wurde für dieses Modell mit einer finalen Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt (Abb. 3.3 C).

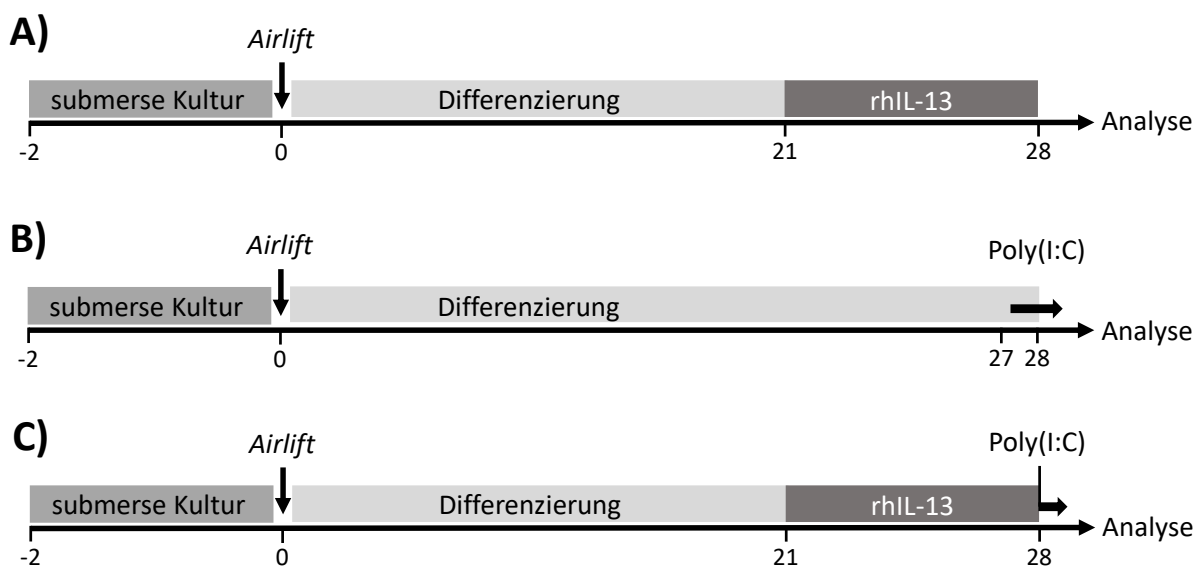


Abb. 3.3: *In vitro* Modell eines Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyps, einer antiviralen Inflammation und einer Asthma-Exazerbation. **A)** Für die Induktion der Merkmale eines Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyps wurden ALI-Kulturen von Tag 21 bis 28 der Differenzierungsphase mit verschiedenen Konzentrationen an rhIL-13 (Endkonzentration: 1 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml rhIL-13) stimuliert. **B)** Poly(I:C) wurde zur Induktion einer Entzündungsreaktion, welche einer antiviralen Inflammation ähnelt, eingesetzt. Dem Differenzierungsmedium wurde für 1 h, 3 h, 6 h, 12 h beziehungsweise 24 h Poly(I:C) in unterschiedlichen Konzentrationen (Endkonzentration: 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml Poly(I:C)) zugesetzt. **C)** Die Behandlung mit 2,5 ng/ml rhIL-13 bzw. 5 ng/ml rhIL-13 für sieben Tage und 5 µg/ml Poly(I:C) für 3 h an Tag 28 wurde kombiniert um ein *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation zu generieren.

3.2 Histopathologie

3.2.1 Aufarbeitung von ALI-Kulturen für histologische Untersuchungen

Für die Analyse der ALI-Kulturen mithilfe von histologischen Verfahren wurden die pseudostratifizierten ALI-Epithelien an Tag 28 aufgearbeitet. Dazu wurden die Transwell-Filter zunächst mit 500 µl HBSS gewaschen und anschließend mit 4 %-iger Formaldehydlösung für 30 bis 60 min fixiert. Es wurden 1 ml Histofix in die basale Kammer und 500 µl Histofix auf die apikale bewachsene Fläche der Filtereinsätze gegeben. Anschließend wurde die Formaldehydlösung abgenommen und mögliche Rückstände durch Waschen mit PBS entfernt. Der Transwell-Filter wurde nun aus der Zellkulturplatte genommen und die Membran mit einem Skalpell aus dem Einsatz geschnitten. Die Membran wurde anschließend in vier Längsstreifen geteilt. Diese Streifen wurden in 2 %-igem Agar eingebettet (Abb. 3.4). Anschließend wurden die ausgehärteten Agarblöcke in einem Autotechnikon entwässert. Die Membranen wurden danach in Paraffin eingebettet, sodass die Schnittflächen der einzelnen Streifen vertikal zum Boden des Ausgießförmchens platziert waren, um nachfolgend senkrecht zur Epithelschicht verlaufende Schnitte anfertigen zu können.

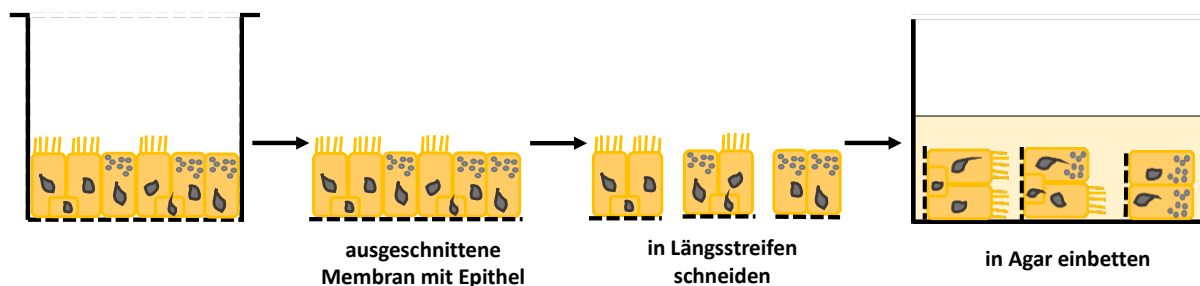


Abb. 3.4: Aufarbeitung von ALI-Kulturen für histologische Untersuchungen. Nach der Fixierung in Formaldehydlösung wurde die Membran gewaschen und anschließend mit einem Skalpell aus dem Transwell-Einsatz geschnitten. Die Membran wurde in vier Längsstreifen geschnitten und die Streifen anschließend in 2 %-igem Agar, wie dargestellt, eingebettet.

3.2.2 Perjodsäure-Schiff-Färbung

Um die Morphologie des pseudostratifizierten ALI-Epithels und mögliche pathologische Veränderungen zu untersuchen, wurden die Paraffinschnitte der Membranen mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion gefärbt. Zunächst wurden mit einem Mikrotom 1,5 µm dicke Schnitte der eingebetteten ALI-Epithelien angefertigt und diese über Nacht bei 37°C getrocknet. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert. Dazu wurden sie

zweimal für 12 min in Xylol getaucht, danach zweimal für 5 min in 100 % Ethanol, für 5 min in 96 % Ethanol und abschließend zweimal für 5 min in 70 % Ethanol. Danach wurden die Schnitte mit Leitungswasser gewässert. Für die Anfärbung von Bestandteilen des Mukus, wie neutrale Mukopolysacchariden sowie Muko- und Glykoproteine, wurde für 10 min mit 1 %-iger Perjodsäure inkubiert. Perjodsäure oxidiert unsubstituierte Glykolgruppen der 1,2-Glykole der Mukusbestandteile zu zwei benachbarten Aldehydgruppen. Anschließend wurde mit Leitungswasser gespült und für 15 min mit Schiffschem Reagenz gefärbt. Dieses enthält fuchsinschweflige Säure, welche an die Aldehydgruppen bindet. Durch diese Bindung entsteht die charakteristische magentarote Färbung der Bestandteile des Mukus. Anschließend wurden Rückstände durch 15-minütiges Wässern mit Leitungswasser entfernt. Als Gegenfärbung wurde für 2 min mit Hämatoxylin gefärbt, wodurch die Zellkerne nach vollständiger PAS-Färbung blau erscheinen. Nachdem für 5 min unter fließendem, warmen Leitungswasser gebläut wurde, wurden die Schnitte dehydriert. Dazu wurde die anfangs beschriebene Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt (2x 5 min 70 % Ethanol, 5 min 96 % Ethanol, 2x 5 min 100 % Ethanol) und zweimal für 5 min in Xylol inkubiert. Zum Schluss wurden die gefärbten Schnitte mit Entellan und einem Deckgläschen eingelegt.

3.2.3 Mukus-Quantifizierung von ALI-Kulturpräparaten

Zur Quantifizierung des Anteils der Becherzellen des pseudostratifizierten ALI-Epithels und des Mukusvolumens wurden ALI-Präparate zunächst mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion gefärbt. Für die Quantifizierung der verschiedenen Parameter wurde das Computerprogramm *New Computer Assisted Stereology Toolbox (newCAST)* verwendet. Um die Morphologie des gesamten Präparats widerzuspiegeln, wurden mithilfe des Programms repräsentative Bildausschnitte der Membranen nach dem Prinzip des *Systematic Uniform Random Sampling (SURS)* (154) automatisch ausgewählt. Zur stereologischen Quantifizierung des Mukus wurden geeignete geometrische Testsysteme, ein Punkteraster für Volumen und ein Raster aus Liniensegmenten für Oberflächenbestimmungen, dem jeweiligen Bildausschnitt überlagert. Mithilfe des Punkterasters wurde die Gesamtanzahl an Testpunkten ermittelt, welche auf PAS gefärbten intrazellulärem Mukus lagen (P_{Mucin}). Außerdem wurde die Summe aller Schnittpunkte zwischen den Testlinien und der Grenzlinie (ΣI_{Ep} , engl. *Intersections I*), hier die Polyestermembran, sowie die Summe aller Schnittpunkte von Liniensegmenten mit Abschnitten der Polyestermembran, die von Becherzellen besetzt sind, (ΣI_{GC}) bestimmt. Die

Anzahl dieser Schnittpunkte ergab sich, indem an der Stelle, an dem ein Liniensegment die Grenzfläche zwischen Polyestermembran und der basalen Epithelseite schnitt, ein Lot gezogen und geprüft wurde, ob dieses Lot Mukus kreuzte. Als eine weitere Variable wurde die Länge der Testlinien pro Testpunkt (*Length per Point*, LP) berechnet, die von der gewählten Vergrößerung, bei der die Bildausschnitte ausgewertet wurden, abhängt. Dieser Wert ergab sich aus der Länge einer einzelnen Linie, der Gesamtanzahl der Linien pro Bild und der Gesamtzahl der Punkte des verwendeten Testpunkterasters.

Anhand der ermittelten Zahlenwerte wurde zunächst der prozentuale Anteil der Fläche der Polyestermembran berechnet, welcher mit Becherzellen bedeckt war. Diese Fläche ergab sich aus dem Verhältnis von der mit Becherzellen besetzten Fläche (S_{GC}) und der Gesamtfläche (S_{Ep}).

$$\frac{S_{GC}}{S_{Ep}} = \frac{\sum I_{GC}}{\sum I_{Ep}}$$

Zusätzlich wurde das Volumen des epithelialen Mukus (V_{Mucin}) anhand der auf PAS-gefärbten intrazellulären Mukusgranula fallenden Testpunkte (P_{Mucin}) pro Fläche des pseudostratifizierten Epithels (S_{Ep}) bestimmt.

$$\frac{V_{Mucin}}{S_{Ep}} = LP \times \frac{\sum P_{Mucin}}{2} \times \sum I_{Ep}$$

Der prozentuale Anteil der Gesamtfläche, die mit Becherzellen besetzt war, und das Mukusvolumen in Bezug auf die Gesamtfläche beziehungsweise pro Becherzelle wurden zur Analyse der Mukusproduktion und Becherzellmetaplasie eingesetzt.

3.2.4 Immunhistochemische Färbung

Die ALI-Epithelien wurden hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung mithilfe immunhistochemischer Färbungen gegen zelltyp-spezifische Markerproteine untersucht. Dafür kam die sogenannte ABC-Methode zum Einsatz. Bei dieser Methode bindet ein Avidin-Peroxidase-Komplex an einen biotinylierten sekundären Antikörper. Da an das Avidin eine

Peroxidase gebunden ist, entsteht durch die Umsetzung von dem Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) eine Farbreaktion (155).

Dafür wurden 1,5 µm dicke Paraffinschnitte (Querschnitt) von ALI-Präparaten angefertigt und über Nacht bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mithilfe von Xylol (2x 12 min) und Alkohol (100 % Ethanol, 2x 5 min) entparaffiniert. Für die Blockade von endogenen Peroxidasen wurden die Schnitte für 30 min mit einem Methanol-Wasserstoffperoxid-Gemisch (6 ml 30 %-iges H₂O₂ auf 200 ml Methanol) inkubiert. Anschließend wurde mehrmals kurz mit Leitungswasser gespült. Zur Vorbehandlung wurden die Präparate für 20 min in Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0) gekocht. Nachdem die Schnitte wieder auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie für 5 min mit TBS gespült. Nun wurden die Objektträger auf *Shandon Coverplates* gelegt, in eine Sequenzkammer gestellt und für circa 5 min mit PBS gespült. Die nachfolgenden Inkubationsschritte wurden ausschließlich bei geschlossener Sequenzkammer durchgeführt. Zur Detektion von CK-5 und acetyliertem α-Tubulin wurden unspezifische Bindestellen mit 100 µl Normalserum (20 min, RT, entsprechend der Spezies des sekundären Antikörpers) blockiert (Tab. 2.5). Die primären Antikörper wurden entsprechend der Angaben in Tabelle 2.5 mit 2 %-igem Milchpulver angesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C mit jeweils 100 µl primären Antikörper pro Objektträger, wurde mit PBS gespült. Der sekundäre Antikörper richtete sich nach der Spezies des primären Antikörpers. Die Schnitte wurden für 30 min bei RT mit 100 µl des sekundären Antikörpers pro Objektträger (1:100, mit 2 %-igem Milchpulver verdünnt) inkubiert. Da der primäre Antikörper für den Nachweis von MUC5AC bereits biotinyliert war, wurde weder Normalserum noch ein sekundärer Antikörper benötigt. Nachdem mit PBS gewaschen wurde, wurden 100 µl ABC Komplex (1000 µl PBS mit 20 µl Komponente A und 20 µl Komponente B) für 30 min auf jeden Objektträger gegeben. Anschließend wurde erneut mit PBS gespült. Die Objektträger wurden nun aus den *Shandon Coverplates* genommen und in eine Küvette überführt. Für die Farbreaktion wurden die Schnitte anschließend für 10 min mit dem chromogenen Substrat DAB inkubiert. Dazu wurden 200 mg DAB in 200 ml Tris/HCL gelöst und filtriert. Direkt vor dem Gebrauch wurden noch 100 µl 30 %-iges Wasserstoffperoxid hinzugefügt. Danach wurde mehrfach mit Leitungswasser gewässert und kurz mit destilliertem Wasser gespült. Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurde für 1 min mit Hämatoxylin inkubiert. Mit Leitungswasser wurde gebläut bis das Wasser klar war und kurz mit destilliertem Wasser gespült. Im Anschluss wurden die gefärbten Präparate mit einer Alkoholreihe dehydriert (2x 5 min 70 % Ethanol, 5 min 96 % Ethanol, 2x 5 min 100 % Ethanol)

und zwei bis dreimal für 5 min mit Xylol inkubiert. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Entellan und einem Deckgläschen eingedeckt.

3.3 RNA-Expressionsanalyse

3.3.1 RNA-Isolierung und Aufreinigung

Zur Gewinnung der *messenger RNA* (mRNA) wurden die apikale und basale Fläche der ALI-Epithelien dreimal mit jeweils 500 µl HBSS gewaschen, um Reste vom Differenzierungsmedium und abgegebenen Mukus zu entfernen. Für die RNA-Isolierung und Aufreinigung wurden 600 µl Lysispuffer (*RNeasy Mini Kit*, Qiagen, Hilden, DE) mit 6 µl β -Mercaptoethanol in die apikale Kammer des Transwell-Einsatzes gegeben. Nach einer kurzen Einwirkzeit bei Raumtemperatur, wurden die Zellen mithilfe einer 1000 µl-Pipettenspitze von der Membran gelöst und die Zellsuspension in ein RNase- und DNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde entweder zur Lagerung bei -80°C eingefroren oder die mRNA direkt isoliert.

Die RNA wurde mithilfe des *RNeasy Mini Kits* der Firma Qiagen (Hilden, DE) nach Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt. Zusätzlich zur mRNA-Aufreinigung wurde ein DNase-Verdau entsprechend des Protokolls des Herstellers durchgeführt. Nachdem die mRNA in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert wurde, wurde eine photometrische Messung mit einem Nanophotometer durchgeführt. Für die Bestimmung der Konzentration der mRNA wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Für die Kontrolle auf Verunreinigungen durch Proteine beziehungsweise Phenole und Kohlenhydrate wurde zusätzlich die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm beziehungsweise 230 nm gemessen und die Quotienten aus der Extinktion bei 260 nm und 280 nm beziehungsweise 230 nm berechnet.

Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

3.3.2 cDNA-Synthese

Für die weitere Analyse der Expressionsmuster der ALI-Zellkulturen wurde die mRNA mit einer reversen Transkription in die entsprechende komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Die cDNA-Synthese der isolierten und aufgereinigten mRNA (Kap. 3.3.1) erfolgte mit dem *Maxima First Strand cDNA Synthese Kit* der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA). Die Umschreibung wurde den Angaben des Herstellers folgend durchgeführt.

3.3.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) beruht auf einer normalen PCR und wurde für die Analyse der Expression ausgewählter Gene eingesetzt. Bei der qRT-PCR ist die Besonderheit, dass eine Quantifizierung durch Fluoreszenz-Messungen möglich ist. Dafür wurde der unspezifische Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* verwendet. *SYBR Green* interkaliert mit doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz proportional zum entstandenen PCR-Produkt zunimmt, welche eine Quantifizierung nach jedem Amplifikationszyklus ermöglicht (156).

Für die qRT-PCR wurden jeweils 2,5 µl cDNA (1:40 mit DEPC-Wasser verdünnt), 5 µl 2-fach SYBR Green Mastermix, 1,5 µl DEPC-Wasser und jeweils 0,5 µl *forward* sowie *reverse* Primer (je 10 pmol/µl) beziehungsweise 1 µl der kommerziellen Quantitect Primer (10 pmol/µl) in spezielle LightCycler-Platten (96-Well-Format) gegeben. Zur Berechnung einer relativen Expression wurde als Referenzgen das ribosomale Protein RPL-32 für jede Probe mitgemessen. Die Amplifikation und Messung des Fluoreszenzsignals wurde mit einem LightCycler 480 II durchgeführt. Das qRT-PCR-Programm startete mit der Denaturierung für jeweils 10 min bei 94°C. Anschließend folgte die Annealing-Phase. Die Temperatur folgte einem Gradienten, sodass mit einer Annealing-Temperatur von 63°C beim ersten Zyklus gestartet wurde, und diese Temperatur mit jedem Zyklus um 0,5°C sank bis eine Temperatur von 58°C erreicht wurde, welche für die folgenden Zyklen weiterverwendet wurde. Nach dem Annealing erfolgte die Elongation bei 72°C, der optimalen Temperatur für die Polymerase. Nach 45 Zyklen wurde eine Schmelzkurve aufgenommen, um die Spezifität der Amplifikation zu kontrollieren. Die weitere Auswertung erfolgte mithilfe der geräteeigenen Software des LightCycler480 II.

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden qRT-PCR-Produkte entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Diese Methode wurde zur Überprüfung der Spezifität der

qRT-PCR-Primer und für eine rein qualitative Auswertung eines qRT-PCR-Produktes eingesetzt. Es wurde ein 2 %-iges Agarosegel verwendet. Dafür wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer erhitzt, bis sich die Agarose komplett gelöst hatte. Nachdem die Mischung leicht abgekühlt war, wurden je nach Größe des Agarosegels 3 µl beziehungsweise 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Mischung aus gelöster Agarose mit dem Ethidiumbromid wurde sofort in einen Gelträger gegossen und ein Probenkamm in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gesetzt. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde der Gelträger in eine entsprechende Elektrophoresekammer umgestellt. Diese Kammer wurde mit TAE-Puffer gefüllt, bis die Elektroden und das Gel mit Puffer bedeckt waren. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die Proben wurden in die daraus resultierenden Vertiefungen pipettiert. Es wurden jeweils 10 µl qRT-PCR-Produkt mit 2 µl 6-fach DNA Ladepuffer gemischt und anschließend 6 µl dieser Mischung auf das Agarosegel aufgetragen. Zum Nachweis des Molekulargewichtes wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 Volt für 60 min. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit einer Dokumentationsstation und dem Programm *Intas GDS* unter UV-Licht. Interkaliert das Ethidiumbromid in die qRT-PCR-Produkte, verändert es sein Absorptionsspektrum, sodass die Nukleinsäuren bei Anregung mit ultraviolettem Licht nachgewiesen werden konnten.

3.3.5 Transkriptomanalyse

Für die Untersuchung eines veränderten Transkriptoms aufgrund verschiedener Stimulationen wurden Expressionsprofile mit den Microarrays *Affymetrix Clariom S Human* der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) generiert. Mit diesem Array können mehr als 20.800 Gene und 337.100 Transkripte mithilfe von mehr als 211.300 Sonden bestimmt werden. Die Arrays, sowie die bioinformatische Auswertung, wurden von der Firma ATLAS Biolabs (Berlin, DE) durchgeführt.

Für die Microarrays wurden jeweils 5 µl der isolierten und aufgereinigten mRNA an die Firma gesandt. In Tabelle 3.3 sind die verschiedenen Proben der insgesamt zehn Spender und deren Bezeichnung während der Auswertungen der Transkriptomanalysen dargestellt.

Tab. 3.3: Verwendete mRNA-Proben für die Transkriptomanalysen. Für die weiteren Analysen der Array-Datensätze erhielten die Proben ein Kürzel bestehend aus einem Buchstaben, der für den Spender steht und einer Zahl, welche einer Stimulation zuzuordnen war.

Spender	Behandlung/Stimulation			
	unbehandelt (-)	5 ng/ml rhIL-13	5 µg/ml Poly(I:C)	5 ng/ml rhIL-13 + 5 µg/ml Poly(I:C)
N543643	A1	A2	A3	A4
N326160	B1	B2	B3	B4
N348757	C1	C2	C3	C4
N382850	D1	D2	D3	D4
N312626	E1	E2	E3	E4
D534647	F1	F2	F3	F4
D419243	G1	G2	G3	G4
D587333	H1	H2	H3	H4
D470633	I1	I2	I3	I4
D600506	K1	K2	K3	K4

Diese Proben wurden zunächst einer Qualitäts- und Quantitätskontrolle seitens ATLAS Biolabs unterzogen. Dafür wurden der Grad der Degradierung ($RIN > 7$) und die Reinheit ($OD_{260}/_{280} \geq 1,5$ und $OD_{260}/_{230} \geq 1,0$) der RNA untersucht. Anschließend fand die Erst- und Zweistrang cDNA-Synthese und Amplifikation statt. Die generierte cDNA wurde aufgereinigt, fragmentiert und markiert. Danach folgten die Hybridisierung, Färbung und das Scannen der *Affymetrix Clariom S Human Gene Chips*. Zum Schluss wurden die Primärdaten mit der Affymetrix Software *Expression Console* ausgewertet.

Für die weitere bioinformatische Auswertung durch ATLAS Biolabs wurden die Primärdaten zunächst mit dem RMA-Verfahren (Quantil-Normalisierung) normiert und anschließend transformiert (\log_2). Für die Analyse, wie sich die verschiedenen Chips untereinander nach der Normalisierung verhielten, wurde eine M versus A Analyse durchgeführt. Daraus ergab sich ein Plot bei denen die Hybridisierungen jedes Chips mit jedem anderen Chip verglichen wurden und der dementsprechende Quotient zwischen jeweils zwei Hybridisierungen dargestellt wurde (Abb. 3.5 A). Identische Chips ergaben eine Varianz von Null.

Eine weitere Auswertung der Hybridisierungsdaten wurde mithilfe des Boxplots dargestellt. Dabei wurden die normierten Werte der gemessenen Intensitäten gegen die einzelnen Proben aufgetragen (Abb. 3.5 B). Mit dieser Analyse wurde eine Symmetrie beziehungsweise Verschiebung der Verteilung nachgewiesen.

Nach der Auswertung der Hybridisierungen wurden die sogenannten *Fold Changes* für jeweils zwei miteinander zu vergleichenden Gruppen berechnet. Dazu wurden die logarithmierten

und normalisierten Intensitäten der einzelnen Proben für jede Gruppe gemittelt und anschließend die Differenz zwischen den Mittelwerten von zwei Gruppen, die miteinander verglichen wurden, berechnet. Anschließend wurde noch der Logarithmus aufgehoben und zusätzlich der p-Wert für diesen *Fold Change* berechnet. Dafür wurde ein t-Test angewandt. Anhand dieser berechneten Werte wurde ein Histogramm der p-Werte erstellt, welches die Anzahl der p-Werte gegen den Zahlenwert des p-Werts aufgetragen zeigte (Abb. 3.5 C). Mit diesen Plots wurde nachgewiesen, ob eine kritische Anzahl an Genen unterschiedlich exprimiert wurde.

Der Volcano Plot zeigte die Beziehung zwischen den p-Werten und dem logarithmierten *Fold Change* der Primärdaten beziehungsweise randomisiert kategorisierten Daten (Abb. 3.5 E). In diesem Plot waren Gene entsprechend ihrer biologischen und statistischen Signifikanz angeordnet. Dementsprechend wurden auch die Signifikanzniveaus des logarithmierten *Fold Changes* ($\log_2\text{-Fold Change} < -1$ und > 1) und p-Wertes (p-Wert $< 0,05$) mit eingetragen (Abb. 3.5 D). Aus diesem Plot wurden erste vielversprechende Kandidaten für die weiteren Analysen schnell identifiziert.

Für den Vergleich zwischen den Expressionsprofilen der zwei Gruppen wurde zusätzlich ein hierarchisches Cluster erstellt, auch *Cluster Dendrogramm* genannt. Dafür wurden die Anzahl der Unterschiede in den normalisierten Expressionswerten gegen die einzelnen Proben aufgetragen (Abb. 3.5 E). Dadurch ergaben sich Proben, die sich näherstanden, weniger Unterschiede aufwiesen und dementsprechend ähnlichere Expressionsprofile aufwiesen oder das Gegenteil.

Für die weitere Analyse der Wirkungen der verschiedenen Stimuli auf die Expressionsprofile wurde noch jeweils eine *Heat Map* der 100 stärksten regulierten Genen basierend auf dem *Fold Change* und p-Wert erstellt. Auf der x-Achse wurden die normierten Expressionsdaten aufgetragen, welche auf der y-Achse zu Clustern zusammengefasst wurden. Dadurch wurde nachgewiesen, ob sich die fünf Proben einer Gruppe jeweils gleich verhielten (Anhang Kap. II, Anhang Abb. A.2 bis Abb. A.7).

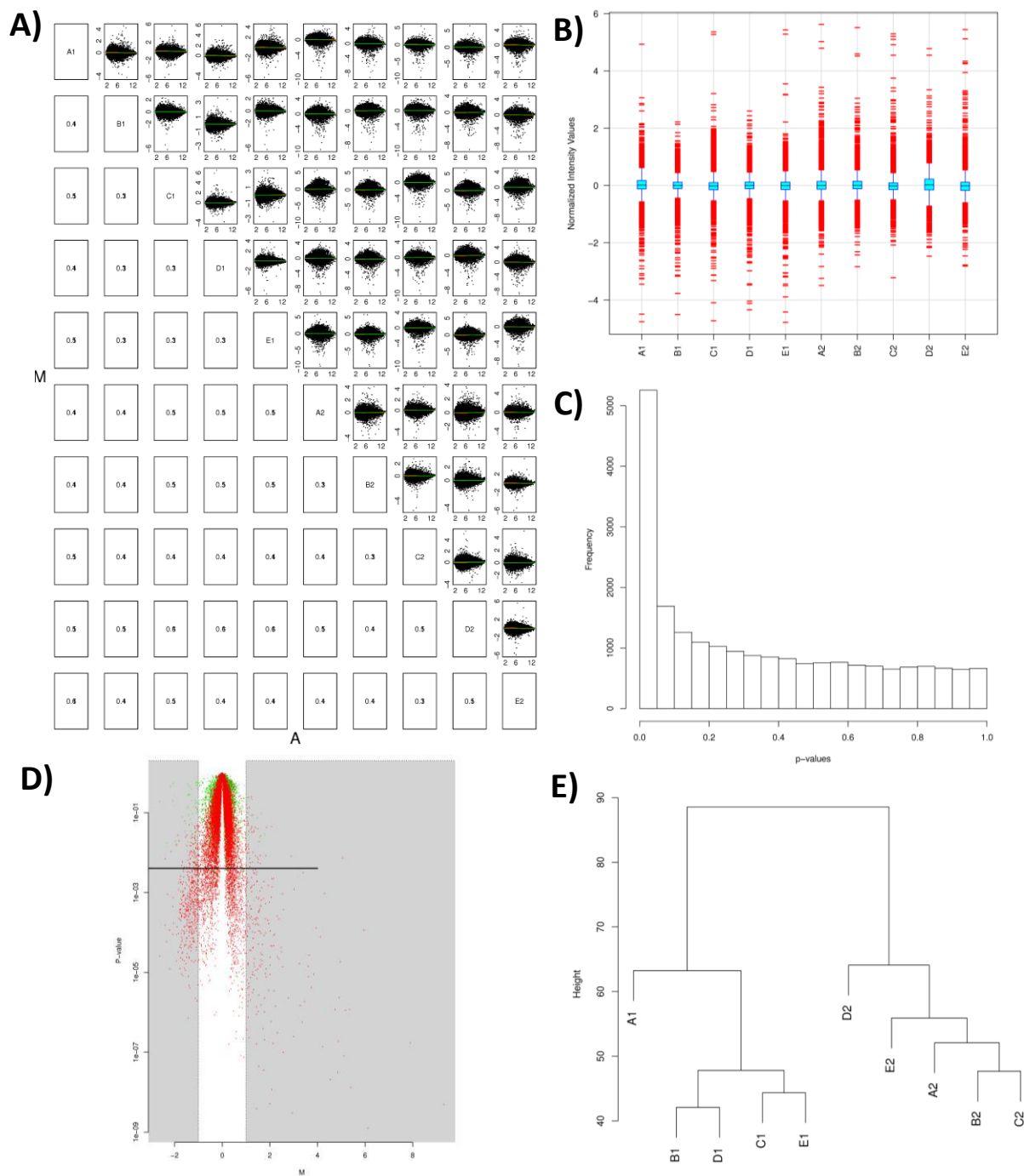


Abb. 3.5: Beispielhafte Darstellung der Auswertungen der Microarrays. **A)** Chip-to-Chip-Vergleich: Die Diagonale zeigt die verglichenen Chips an. Rechts: Varianzen der verglichenen Chips (rote und grüne Linien). Links: Quotienten der Varianzen zweier Chips. **B)** Boxplot: Verteilung der normalisierten Intensitätswerte. Box im Plot: mittlere 50 % der normalisierten Intensitätswerte. 75 %-Perzentile oben, 25 %-Perzentile unten, die Linie zeigt den Median. **C)** Histogramm der p-Werte: y-Achse ist die Häufigkeit der p-Werte, x-Achse zeigt die p-Werte. **D)** Volcano Plot: Beziehung zwischen p-Wert und \log_2 -Fold Change. Rot: Originaldaten, grün: die randomisierten und kategorisierten Daten. Auf der x-Achse die \log_2 -Fold Changes und auf der y-Achse die p-Werte. Der graue Bereich zeigt die signifikanten \log_2 -Fold Changes (Grenze $-1 < \log_2$ -Fold Change und \log_2 -Fold Change > 1). Schwarze horizontale Linie: Signifikanzniveau für den p-Wert von 0,05 an. **E)** Dendrogramm: hierarchische Clustering der einzelnen Proben anhand der Mittelwerte der Expressionswerte. Clustering mit den einzelnen Proben entlang der x-Achse angeordnet, Wert der Unterschiede auf der y-Achse dargestellt. $n = 5$.

Für die Untersuchung von Interaktionen zwischen den identifizierten potentiellen Biomarkern wurde ein funktionelles Netzwerk mit dem Programm STRING erstellt. Es wurde durch ein Konsortium aus dem SIB (Swiss Institute of Bioinformatics), CPR (NNF Center for Protein Research) und EMBL (European Molecular Biology Laboratory) entwickelt, welches die Software für diese Analyse kostenfrei zur Verfügung stellte (Tab. 2.9). Basierend auf den eingegebenen Proteinen wird ein Netzwerk erstellt, welches in dieser Arbeit für die Vorhersage von Interaktionen zwischen den Proteinen verwendet wurde. Diese Vorhersagen wurden aufgrund von Daten aus kuratierten Datenbanken und Abstrakts veröffentlichter wissenschaftlicher Arbeiten getroffen. STRING verwendet dabei die Datenbanken BIND, DIP, GRID, HPRD, IntAct, MINT und PID für experimentelle Daten und als kuratierte Datenbanken Biocarta, BioCyc, CO, KEGG und Reactome (157).

3.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung wurde das Computer-Programm *GraphPad Prism 7* verwendet. In den Graphen sind die arithmetischen Mittelwerte \pm die Standardabweichung (SD) dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde eine ungepaarte *One-Way Analysis of Variance* (One-Way ANOVA) mit angeschlossenem *Dunetts t-Test* durchgeführt. Mithilfe dieses Post-hoc Tests wurde ermittelt, ob sich die Werte der verschiedenen Behandlungsgruppen von der jeweiligen Kontrollgruppe signifikant unterschied. Weiterhin wurde bei einem Vergleich von zwei Gruppen mit gleicher Stimulation (Abb. 4.12) ein ungepaarter t-Test genutzt. Bei mehreren einflussnehmenden Faktoren wurde eine *Two-Way Analysis of Variance* (Two-Way ANOVA) mit anschließendem *Tukey's Multiple Comparison* Post-hoc Test (Abb. 4.6) verwendet. Es wurde für alle statistische Tests ein Signifikanzniveau mit einem p-Wert von 0,05 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Ein *in vitro* Modell des humanen Atemwegsepithels zur Untersuchung einer Asthma-Exazerbation

4.1.1 Humane Bronchialepithelzellen differenzieren unter ALI-Zellkulturbedingungen zu einem pseudostratifizierten Epithel

Das humane Atemwegsepithel besteht *in vivo* aus einem gerichteten Zellverband mit verschiedenen Zelltypen. Dementsprechend wurde im ersten Schritt dieser Arbeit versucht, ein 3D-Zellkulturmodell mit humanen Bronchialepithelzellen von lungen-gesunden und asthmatischen Spendern aufzubauen, welches dem Atemwegsepithel *in vivo* möglichst ähnlich war. Dafür wurden HBECs zunächst unter submersen Bedingungen expandiert und anschließend auf Polyestermembranen für maximal 28 Tagen mit dem Differenzierungsmedium unter ALI-Bedingungen kultiviert (Kap. 3.1, Abb. 3.2). Um den Verlauf der Differenzierung zu untersuchen und das entstehende *in vitro* Epithel zu charakterisieren, wurden an verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 nach dem *Airlift*) die Morphologie und Genexpression untersucht.

Für die Untersuchung der Ausbildung des Epithels wurden zunächst fixierte, entwässerte und in Paraffin eingebettete ALI-Präparate von NHBECs geschnitten und mit der PAS-Methode gefärbt (Kap. 3.2.2). Am Tag des *Airlifts* (Tag 0) war die Membran mit einer konfluenten Zellschicht bewachsen. Diese Zellen proliferierten bis zum Tag 14 zu einem mehrreihigem Zellverband. ALI-Zellkulturen von Tag 14 zeigten erste mit Mukus gefüllte Sekretgranula an der Apikalseite, welche sich bis zum Tag 28 weiter ausbildeten (Abb. 4.1 A). Für die Untersuchung, ob sich das gebildete ALI-Epithel von NHBECs und DHBECs unterschied, wurden auch ALI-Präparate von DHBECs mit der PAS-Methode gefärbt (Kap. 3.2.2). ALI-Zellkulturen mit DHBECs wiesen den gleichen Verlauf der Differenzierung wie die NHBECs auf (Abb. 4.1 B). Allerdings schien an Tag 28 bei den Zellkulturpräparaten der DHBECs im Vergleich zu ALI-Epithelien von NHBECs mehr PAS-positiv gefärbter gespeicherter Mukus im apikalen Teil der Zelle zu beobachten zu sein (Abb. 4.1 A & B).

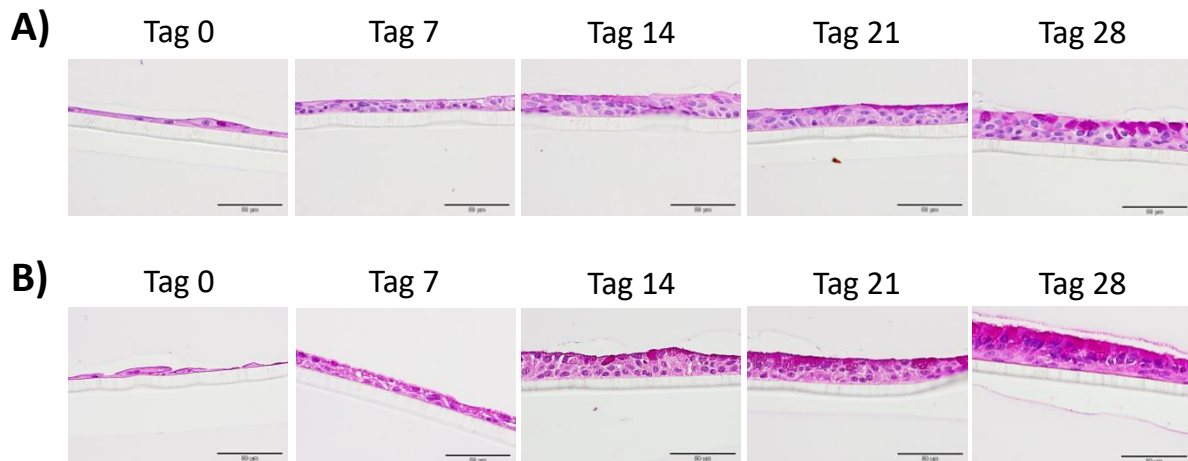


Abb. 4.1: Der Verlauf der *in vitro* Ausbildung eines mehrreihigen Atemwegsepithels. Es wurden Schnitte von ALI-Zellkulturpräparate von NHBEs (A) und DHBEs (B) an Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 nach dem *Airlift* angefertigt und diese mit der PAS-Methode gefärbt. Es ist jeweils der Verlauf von einem lungen-gesunden und einem asthmatischen Spender aus einem von insgesamt je fünf unabhängigen Experimenten gezeigt. Maßstabsbalken: 50 µm.

Für die weitere Untersuchung des *in vitro* Epithels wurde im nächsten Schritt die relative Genexpression von zelltyp-spezifischen Genen mit einer qRT-PCR (Kap. 3.3.3) in den ALI-Zellkulturen der NHBEs gemessen. Für die Basalzellen des Atemwegsepithels wurde das Gen *Zytokeratin-5* (*CK-5*) als zelltyp-spezifisches Marker-Gen gewählt, welches an Tag 0 der Differenzierung von NHBEs sehr stark exprimiert wurde ($8,07 \pm 4,01$). Diese Expression nahm bis Tag 7 signifikant ab ($2,16 \pm 1,05$). Im weiteren Verlauf der Differenzierung nahm die Genexpression von *CK-5* bis Tag 28 weiterhin leicht ab (Abb. 4.2 A links). Die sekretorischen Club- und Becherzellen ließen sich anhand der Genexpression von *CC-10* (*Clara Cells 10 kDa secretory protein*) und der Genexpression des Hauptmuzins *MUC5AC* nachweisen. Die Expression beider Gene lag in ALI-Zellkulturen von NHBEs am Tag des *Airlifts* unterhalb des Detektionslimits. An Tag 14 wurde für beide Gene eine signifikante Erhöhung der Genexpression gemessen (*CC-10*: $0,53 \pm 0,35$; *MUC5AC*: $0,17 \pm 0,14$), welche im weiteren Verlauf der Kultivierung unter ALI-Bedingungen gleichbleibend weiter exprimiert wurden (Abb. 4.2 A Mitte). Weiterhin wurde die Genexpression von *FoxJ1* als Marker für zilientragende Zellen untersucht. In ALI-Zellkulturen von NHBEs konnte am Tag des *Airlifts* und Start der Differenzierung keine Genexpression für *FoxJ1* gemessen werden. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm die Expression von *FoxJ1* stetig zu, sodass an Tag 28 nach dem *Airlift* eine signifikant erhöhte Expression nachgewiesen wurde ($1,09 \pm 0,81$) (Abb. 4.2 A rechts).

Für die Charakterisierung der Differenzierung von ALI-Zellkulturen von DHBEs wurden die gleichen zelltyp-spezifischen Marker-Gene wie für die NHBEs mittels qRT-PCR ausgewertet

(Kap. 3.3.3). An Tag 0 wurde *CK-5* als einziges der vier dargestellten Gene nachweisbar exprimiert ($7,94 \pm 4,82$), dessen Expression bis zum nächsten Messzeitpunkt an Tag 7 stark abnahm ($2,40 \pm 1,71$) (Abb. 4.2 B links). Diese Expression war in den ALI-Zellkulturen der DHBECS vergleichbar mit dem mRNA-Level für NHBEs an Tag 7 (Abb. 4.2). Im weiteren Verlauf der Differenzierung wurde *CK-5* mit einem unveränderten Wert weiter exprimiert (Abb. 4.2 B links). Insgesamt gab es keine signifikanten Unterschiede in der Expression von *CK-5* in ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBEs des jeweils gleichen Zeitpunktes. Der Verlauf der Expression von *CC-10* und *MUC5AC* für ALI-Zellkulturen von DHBEs war vergleichbar mit der Expression in differenzierenden NHBEs (Abb. 4.2). Die mRNA-Expression von *CC-10* und *MUC5AC* lag am Tag des *Airlifts* unterhalb des Detektionslimits. Während die Genexpression von *CC-10* ab Tag 7 gemessen werden konnte, ergab sich für *MUC5AC* erst an

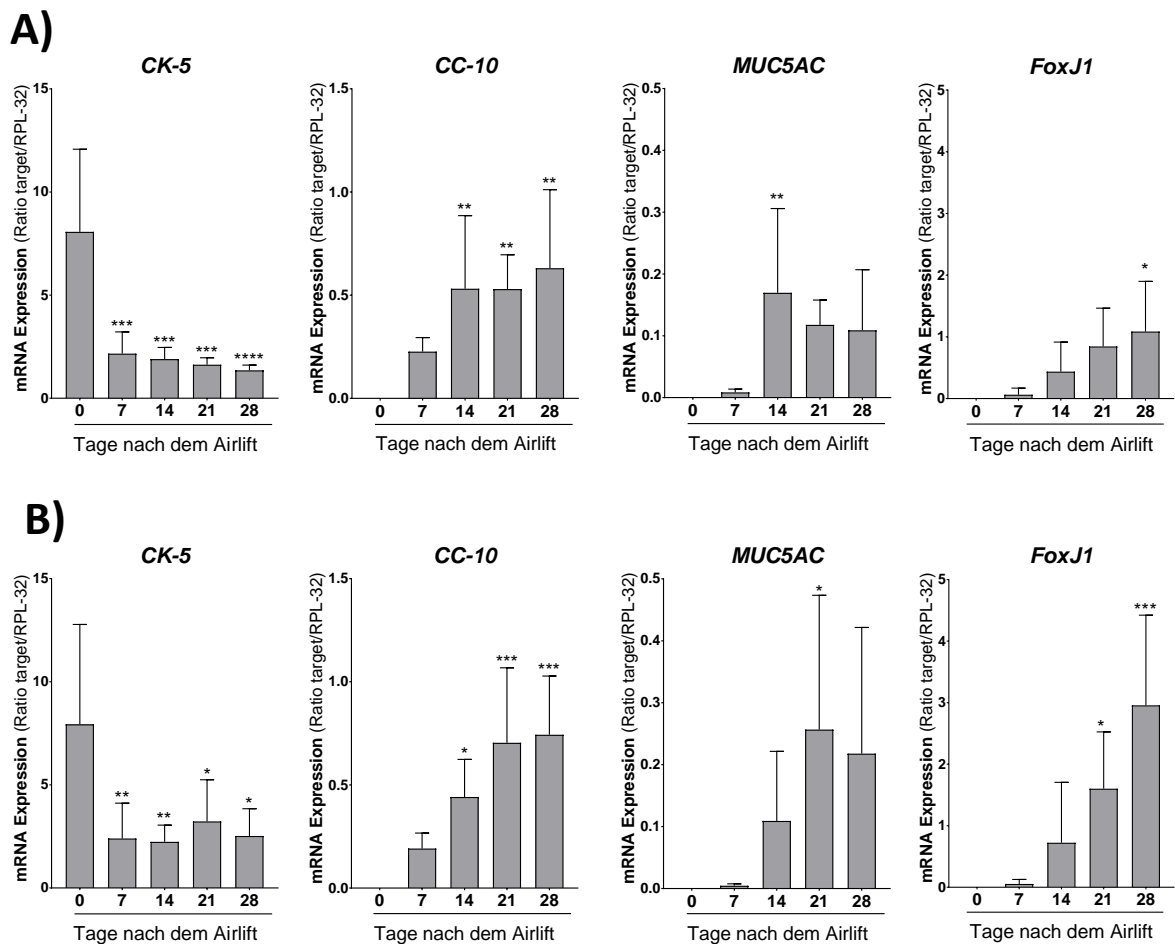


Abb. 4.2: Genexpression von zelltyp-spezifischen Markern des *in vitro* Epithels während der Differenzierung. Es wurde die relative Genexpression von *CK-5* spezifisch für Basalzellen, *CC-10* für Clubzellen, *MUC5AC* für Becherzellen und *FoxJ1* für ziliotragende Zellen an Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 nach dem *Airlift* in ALI-Zellkulturen von NHBEs (**A**) und DHBEs (**B**) mittels qRT-PCR gemessen. $n = 5$, $MW \pm SD$, One-Way ANOVA mit Dunnett's Post-Test (signifikant zu Tag 0, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ & **** $p < 0,0001$).

Tag 14 eine nachweisbare Genexpression (Abb. 4.2 Mitte). Die Expression von *CC-10* stieg bis Tag 21 ($0,70 \pm 0,36$) weiter an und wurde sowohl in ALI-Epithelien von DHBECS als auch NHBECS in vergleichbare Höhe exprimiert (Abb. 4.2). Für die Expression von *MUC5AC* wurde in ALI-Kulturen von DHBECS ab Tag 21 ein signifikanter Unterschied zu Tag 0 gemessen ($0,26 \pm 0,22$) (Abb. 4.2 B Mitte), während diese Expression in NHBECS bereits an Tag 14 signifikant erhöht war (Abb. 4.2 A Mitte). Das Gen *FoxJ1* wurde in den Zellen der asthmatischen Spender stärker exprimiert als in den NHBECS. Während die Expression von *FoxJ1* an Tag 7 noch vergleichbar war, ergab sich im weiteren Verlauf eine 3-fach erhöhte Expressionsrate für ALI-Zellkulturen von DHBECS im Vergleich zu NHBECS. Diese Expressionslevel von *FoxJ1* waren jedoch zwischen NHBECS und DHBECS nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 4.2).

Neben der Genexpression wurde die Differenzierung zu einem pseudostratifizierten Epithel auch auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden ALI-Präparate der verschiedenen Zeitpunkte mit spezifischen Antikörpern gegen CK-5, MUC5AC und acetyliertem α -Tubulin, welches in den Zilien synthetisiert wird, mit einem immunhistochemischen Verfahren gefärbt (Kap. 3.2.4). Entsprechend der Genexpressions-Ergebnisse (Abb. 4.2) bestand der Zellverband der NHBECS beziehungsweise DHBECS an Tag 0 und Tag 7 lediglich aus Basalzellen, welche CK-5 synthetisierten. Erst ab Tag 14 traten an der Apikalseite des inzwischen mehrreihigen Epithels einige Zellen auf, die negativ für CK-5 waren. Die ALI-Präparate der NHBECS sowie DHBECS der weiteren Zeitpunkte bestanden an der basalen Seite aus Basalzellen, während die Zellen der apikalen Seite MUC5AC und acetyliertes α -Tubulin synthetisierten (Abb. 4.3).

Hinsichtlich der Lokalisation und Anzahl der Basalzellen ergaben sich zwischen NHBECS und DHBECS keine relevanten Unterschiede (Abb. 4.3). Der produzierte und gespeicherte Mukus in den Granula der Becherzellen war sowohl bei ALI-Zellkulturen von NHBECS als auch DHBECS erst ab Tag 14 anhand des Hauptmuzins MUC5AC nachweisbar. Im weiteren Verlauf der Differenzierung nahm die prozentuale Bedeckung mit Becherzellen sowie das Volumen an MUC5AC-positiv gefärbten Granula in den Becherzellen zu. Dabei ergaben sich in den Präparaten der DHBECS ab Tag 21 leicht Unterschiede zu den NHBECS. Entsprechend der PAS-Färbungen (Abb. 4.1) schien das ALI-Epithel von DHBECS einen höheren Anteil an MUC5AC-positivem gespeichertem Mukus in den Sekretgranula der Becherzellen zu zeigen (Abb. 4.3). Die Zilien der zilientragenden Zellen in *in vitro* Epithelien konnten ab Tag 21 sowohl für NHBECS als auch DHBECS anhand der immunhistochemischen Färbung gegen acetyliertes α -Tubulin auf der apikalen Epithelseite nachgewiesen werden. Die Bedeckung mit

zilientragenden Zellen schien in den ALI-Zellkulturen von NHBEs leicht höher als bei den DHBEs (Abb. 4.3). Insgesamt konnten somit Basalzellen an der basalen Seite sowie mukusproduzierende Becherzellen und zilientragende Zellen an der Apikalseite eines mehrreihigen *in vitro* Epithels nachgewiesen werden.

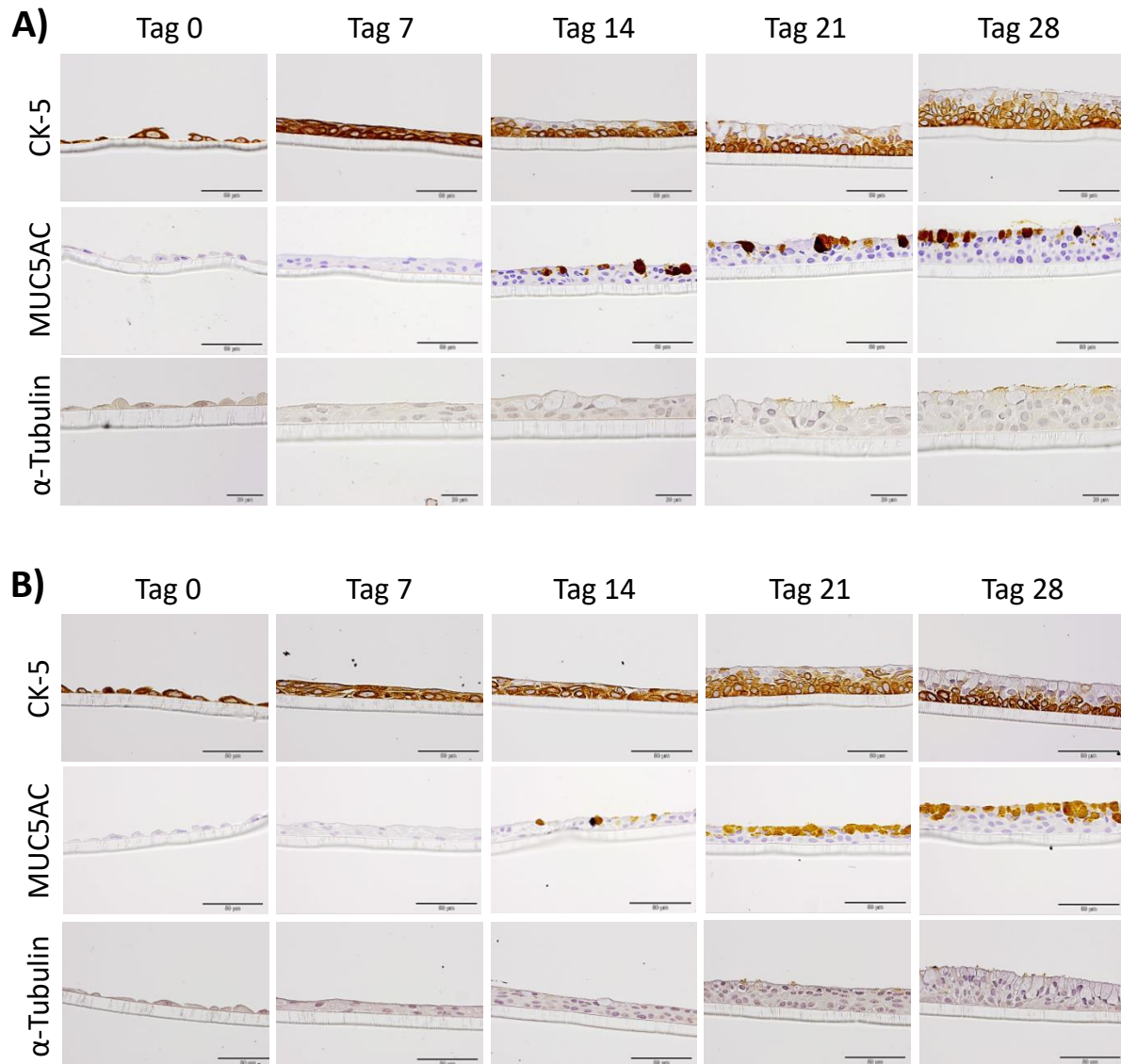


Abb. 4.3: *In vitro* Differenzierung von ALI-Epithelien zu einem mukoziliären Phänotyp. Die Basalzellen, mukusproduzierenden Zellen und zilientragenden Zellen des *in vitro* Epithels wurden durch eine immunhistochemische Färbung gegen die Proteine CK-5, MUC5AC und acetyliertes α -Tubulin in ALI-Zellkulturpräparaten von NHBEs (A) und DHBEs (B) nachgewiesen. Es wurden ALI-Zellkulturpräparate der Zeitpunkte Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 nach dem *Airlift* verwendet. Es ist jeweils ein lungen-gesunder (A) und ein asthmatischer Spender (B) aus einem von insgesamt je fünf voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt. Maßstabsbalken: 50 μ m, für acetyliertes α -Tubulin in (A) 20 μ m.

4.1.2 rhIL-13 induziert im ALI-Epithel einen Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyp

Das Atemwegsepithel eines Asthmatikers unterscheidet sich von dem Epithel eines gesunden Individuums (96). Dementsprechend war es für die Untersuchung der epithelialen Antwort während einer Asthma-Exazerbation wichtig die Charakteristika eines asthmatischen humanen Atemwegsepithels auch im ALI-Zellkulturmodell nachstellen zu können. Das Th₂-Zytokin IL-13 gilt als ein wichtiger Regulator bei Asthma und induziert viele epitheliale Charakteristika dieser Erkrankung. Durch IL-13 wechselt das Atemwegsepithel von einem mukoziliären zu einem sekretorischen Phänotyp mit einer Becherzellmetaplasie und Hypersekretion von Mukus. Zusätzlich induziert es die Freisetzung von Eotaxinen durch das Epithel (158).

Dementsprechend wurde rekombinantes humanes Interleukin-13 (rhIL-13) eingesetzt um *in vitro* einen Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyp zu etablieren. Dafür wurden ALI-Zellkulturen von NHBEs beziehungsweise DHBEs von Tag 21 bis zur Ernte an Tag 28 der Differenzierung mit rhIL-13 stimuliert (Kap. 3.1.5, Abb. 3.3 A). Anschließend wurde die Ausbildung eines Th₂-polarisierten *in vitro* Epithels auf Gen- und Proteinebene ausgewertet. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen von rhIL-13 analysiert, um eine optimale Wirkung dieses Zytokins auf das Epithel zu erzielen.

Da IL-13 der primäre Regulator der Hyperproduktion des Mukus ist, wurde zunächst die Genexpression des Hauptmuzins *MUC5AC* mittels qRT-PCR untersucht (Kap. 3.3.3). Ohne rhIL-13-Stimulation wurde, wie schon während der Differenzierung in ALI-Zellkulturen von NHBEs, *MUC5AC* in einer geringen Höhe exprimiert ($0,08 \pm 0,06$). Durch die Applikation von rhIL-13 von Tag 21 bis Tag 28 wurde die Expression von *MUC5AC* stark induziert. Ab einer Konzentration von 5 ng/ml konnte in ALI-Zellkulturen von NHBEs eine signifikant erhöhte Genexpression ($2,21 \pm 1,08$) gemessen werden, die bei Stimulation mit 10 ng/ml rhIL-13 weiter zunahm (Abb. 4.4 A links).

IL-13 ist zusätzlich für die Freisetzung von Eotaxinen durch das Atemwegsepithel verantwortlich (158), sodass außerdem die Genexpression von *CCL26* (Eotaxin 3) gemessen wurde. Durch die Behandlung mit rhIL-13 wurde die Genexpression von *CCL26* in differenzierten ALI-Epithelien von NHBEs induziert. Für *CCL26* konnte bei einer Stimulation mit 5 ng/ml IL-13 ein signifikanter Anstieg der Genexpression ($22,95 \pm 6,68$) in ALI-Zellkulturen

von NHBEs nachgewiesen werden. Durch eine höhere Konzentration an rhIL-13 wurde diese Expression noch weiter verstärkt (Abb. 4.4 A Mitte).

Woodruff *et al.* zeigten, dass die Gene *CLCA1* (*Chloride Channel, Calcium Activated, Family Member 1*), *Periostin* und *SerpinB2* (*Serine Family B Member 2*) in epithelialen Bürstungen der Atemwege von Asthmatischer hoch reguliert waren (159). Dementsprechend wurden zum Nachweis eines Th₂-polarisierten *in vitro* Epithels zusätzlich die relative Expression von *CLCA1* und *SerpinB2* gemessen. Die Genexpression von *CLCA1* war in unbehandelten ALI-Epithelien von NHBEs nicht messbar. Wurden ALI-Zellkulturen von NHBEs jedoch mit rhIL-13 stimuliert, kam es zu einer Zunahme der Genexpression. Diese Expression wurde mit einer höheren eingesetzten rhIL-13-Gabe weiter verstärkt. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml rhIL-13 unterschied sich die Expression von *CLCA1* signifikant von der unstimulierten Probe ($8,21 \pm 6,48$) (Abb. 4.4 A Mitte). Auch für *SerpinB2* konnte gezeigt werden, dass durch Applikation von rhIL-13 bei ALI-Epithelien von NHBEs die Genexpression induziert wurde. Die Erhöhung der Expression von *SerpinB2* erfolgte wie schon für *MUC5AC*, *CCL26* und *CLCA1* rhIL-13-konzentrationsabhängig. Für *SerpinB2* konnte ein signifikanter Unterschied zur unstimulierten Kontrolle nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration an rhIL-13 nachgewiesen werden ($3,31 \pm 2,72$) (Abb. 4.4 A rechts).

Die beschriebenen vier Gene wurden auch an rhIL-13-behandelten ALI-Epithelien von DHBEs gemessen (Kap. 3.3.3). Wurden ALI-Zellkulturen von DHBEs mit rhIL-13 stimuliert, konnte ein sehr ähnlicher Verlauf der Genexpression von *MUC5AC* im Vergleich zu ALI-Epithelien von NHBEs beobachtet werden (Abb. 4.4 A & B links). Während für die unstimulierte Kontrolle und bei einer Konzentration von 1 ng/ml rhIL-13 nur eine geringe Expressionsrate für *MUC5AC* vorlag, stieg diese mit steigender Konzentration an eingesetztem rhIL-13 an (Abb. 4.4 B links). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen NHBEs und DHBEs für die einzelnen Konzentrationen nachgewiesen (Abb. 4.4 A & B links).

Weiterhin wurde für die Expression von *CCL-26* bei einer eingesetzten Konzentration von 10 ng/ml rhIL-13 ($23,13 \pm 20,94$) ein signifikanter Unterschied zur unstimulierten Kontrolle in ALI-Epithelien von DHBEs gemessen (Abb. 4.4 B Mitte). Insgesamt zeigte die Expression für *CCL-26* zwischen lungen-gesunden und asthmatischen Spendern keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.4. A & B Mitte).

In ALI-Zellkulturen von DHBEs wurde wie schon zuvor für ALI-Epithelien von NHBEs, ein Anstieg der Genexpression von *CLCA1* abhängig von der Konzentration des eingesetzten rhIL-

13 gemessen. Durch sehr große Schwankungen in der Expression dieses Gens zwischen den einzelnen Spendern der DHBECS war jedoch kein Wert signifikant unterschiedlich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 4.4 B Mitte). Insgesamt war die Expression von *CLCA1* in den rhIL-13-behandelten ALI-Epithelien von DHBECS geringer als in den entsprechenden Proben der NHBECS und für eine Konzentration von 10 ng/ml rhIL-13 sogar signifikant unterschiedlich (Abb. 4.4 A & B Mitte). In ALI-Zellkulturen von DHBECS wurde ebenso, wie zuvor für die NHBECS, ein rhIL-13-konzentrationsabhängiger Anstieg der Expression von *SerpinB2* gemessen. In ALI-Epithelien von DHBECS ergab sich bereits bei einer eingesetzten Konzentration von 1 ng/ml rhIL-13 ($0,75 \pm 0,27$) ein signifikanter Unterschied zur unstimulierten Kontrolle. Auch die gemessenen relativen Expressionen für die weiteren eingesetzten höheren Konzentrationen an rhIL-13 waren im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 4.4 B links). Für *SerpinB2* ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den

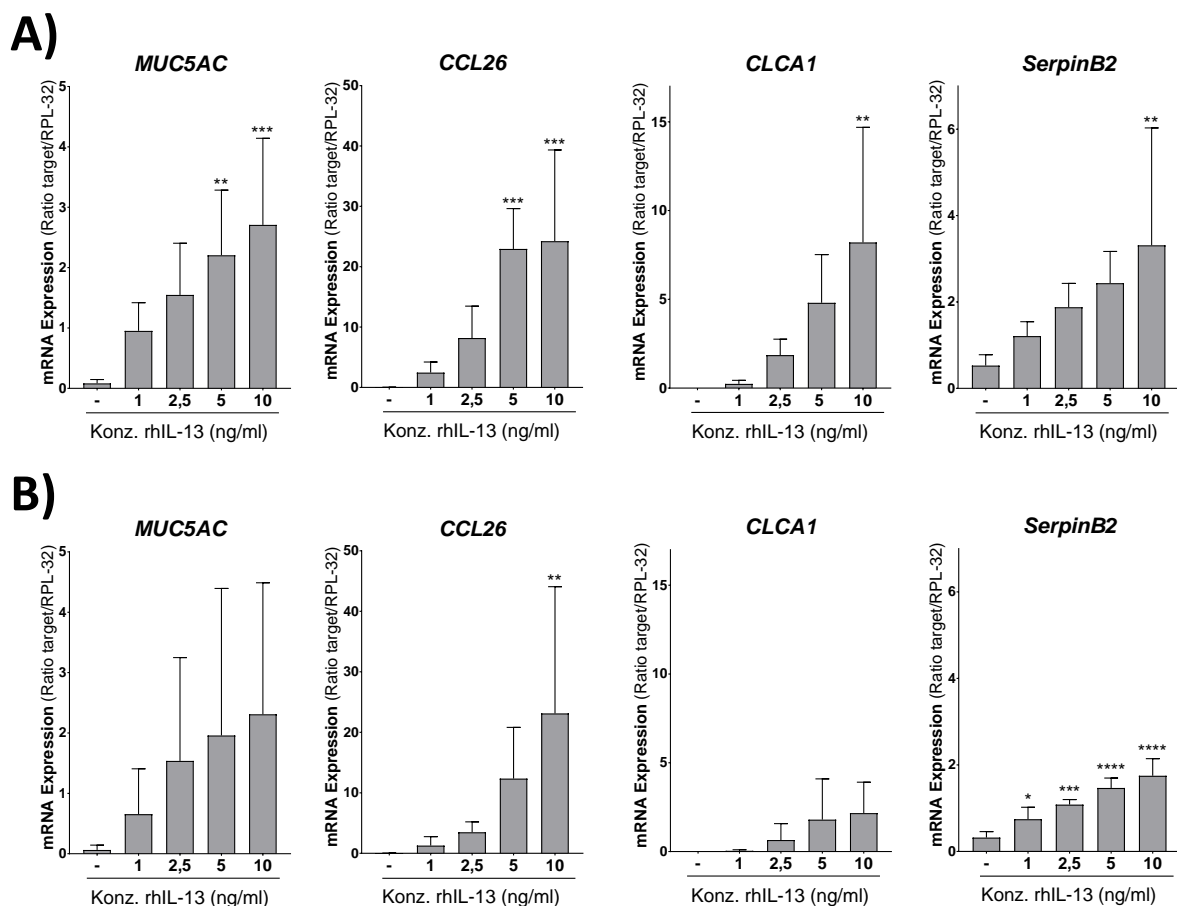


Abb. 4.4: Genexpression phänotyp-spezifischer Gene in einem Th₂-polarisierten ALI-Epithel. ALI-Epithelien von NHBECS (A) und DHBECS (B) wurden von Tag 21 bis Tag 28 der Differenzierung mit 1 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml bzw. 10 ng/ml rhIL-13 über die basale Seite stimuliert. Anschließend wurde die relative Genexpression von *MUC5AC*, *CCL26*, *CLCA1* und *SerpinB2* mittels qRT-PCR ermittelt. n = 5, MW ± SD, One-Way ANOVA mit Dunnett's Post-Test (signifikant zur unstimulierten Kontrolle, * p < 0, 05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 & **** p < 0,0001).

NHBECs und DHBECs, auch wenn der Mittelwert in ALI-Zellkulturen von NHBECs größer war als bei den entsprechenden DHBECs (Abb. 4.4 A & B links).

Zur Untersuchung, ob die Behandlung mit rhIL-13 in ALI-Zellkulturen die charakteristische Becherzellmetaplasie und Mukus-Hyperproduktion induziert, wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen gegen das Hauptmucin MUC5AC (Kap. 3.2.4) durchgeführt. In den gefärbten Paraffinschnitten der ALI-Epithelien von NHBECs wurde beobachtet, dass ohne rhIL-13-Behandlung circa die Hälfte der Membran mit mukusproduzierenden Becherzellen bedeckt war. Bei einer geringen Konzentration von 1 ng/ml rhIL-13 ergab sich in den immunhistologisch gefärbten ALI-Epithelien keine veränderte Morphologie des Epithels in Bezug auf die Synthese von MUC5AC. Der prozentuale Anteil an Becherzellen nahm mit steigender Konzentration an rhIL-13 zu. Bereits bei einer eingesetzten Konzentration von 2,5 ng/ml rhIL-13 war der Großteil der Apikalseite des Epithels mit MUC5AC-positiven Zellen bedeckt. Zusätzlich war das Volumen an gespeichertem Mukus erheblich erhöht. Bei einer Konzentration von 5 ng/ml rhIL-13 und 10 ng/rhIL-13 bestand nahezu die gesamte apikale Seite aus Becherzellen mit einer großen Menge an intrazellulärem Mukus (Abb. 4.5 A).

Zusätzlich zur visuellen Bewertung der immunhistochemischen Färbung wurde der prozentuale Anteil der Bedeckung der basalen Membran durch Becherzellen bei ALI-Epithelien von NHBECs sowie das intrazelluläre Mukusvolumen quantitativ histologisch analysiert (Kap. 3.2.3). In der unstimulierten Kontrolle war die Hälfte der Membran mit PAS-positiven Becherzellen bedeckt ($53,88 \pm 7,35 \%$). Bei einer Stimulation mit 1 ng/ml rhIL-13 ergab sich ein signifikanter Anstieg des Anteils der Membran, der mit Becherzellen bedeckt war ($81,55 \pm 6,79 \%$). Diese prozentuale Bedeckung stieg mit höheren rhIL-13-Konzentrationen weiter, bis letztendlich bei einer Konzentration von 5 ng/ml rhIL-13 beziehungsweise bei 10 ng/ml rhIL-13 fast die gesamte Apikalseite der basalen Membran mit Becherzellen bedeckt war (Abb. 4.5 B links). Das Volumen des gespeicherten Mukus pro Flächeneinheit nahm entsprechend der Bedeckung mit Becherzellen mit steigender rhIL-13-Konzentration zu (2,5 ng/ml rhIL-13: $15,42 \pm 3,06 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) bis bei einer eingesetzten Konzentration von 5 ng/ml rhIL-13 ($19,88 \pm 5,58 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) das Maximum erreicht wurde und sich auch bei höherer Konzentration von rhIL-13 nicht weiter veränderte (Abb. 4.5 B Mitte). Das Mukusvolumen nahm jedoch nicht nur aufgrund der erhöhten Bedeckung mit Becherzellen in rhIL-13-behandelten ALI-Epithelien von NHBECs zu. Gleichzeitig erhöhte sich das Volumen an gespeichertem Mukus pro Becherzelle. Wurden die ALI-Zellkulturen mit 2,5 ng/ml rhIL-13

behandelt, stieg das Volumen des intrazellulären Mukus bereits signifikant auf $1,79 \pm 0,39 \mu\text{m}^3$ pro Zelle an. Entsprechend des Anteils an Becherzellen, der die Membran bedeckte, und des Mukusvolumens pro Flächeneinheit, ergab sich das höchste gemessene Volumen an gespeichertem Mukus pro Becherzelle bei einer Konzentration von 5 ng/ml rhIL-13 ($2,094 \pm 0,59 \mu\text{m}^3/\text{Zelle}$) (Abb. 4.5 B rechts).

Zur Charakterisierung der Wirkung von rhIL-13 auf ALI-Epithelien von Zellen asthmatischer Spender, wurden rhIL-13-behandelte ALI-Epithelien immunhistochemisch mittels einer Färbung gegen MUC5AC untersucht (Kap. 3.2.4). Wie schon zuvor für die ALI-Epithelien der NHBEs, war bei den DHBEs ohne Stimulation mit rhIL-13 circa die Hälfte der Apikalseite der Membran mit MUC5AC-positiven Becherzellen bedeckt. Analog zu den rhIL-13-behandelten ALI-Epithelien von NHBEs, nahm auch in ALI-Zellkulturen von DHBEs die Bedeckung mit Becherzellen und das intrazelluläre Mukusvolumen mit steigender Konzentration an rhIL-13 zu. Bei einer eingesetzten Konzentration von 5 ng/ml rhIL-13 war die apikale Seite der Membran nahezu komplett mit angefärbten Mukus bedeckt. Eine weitere Erhöhung der eingesetzten Konzentration auf 10 ng/ml rhIL-13 ergab keine weitere Steigerung hinsichtlich des Anteils an Becherzellen und Volumens des gespeicherten Mukus (Abb. 4.5 C).

Zusätzlich zur immunhistochemischen Färbung gegen MUC5AC wurden rhIL-13-behandelte ALI-Epithelien von DHBEs quantitativ hinsichtlich einer Becherzellmetaplasie und Mukus-Hyperproduktion mit dem Programm *newCAST* (Kap. 3.2.3) ausgewertet. Auch die ALI-Zellkulturen von Zellen asthmatischer Spender zeigten einen rhIL-13-konzentrationsabhängigen Anstieg der prozentualen Bedeckung der Membran mit Becherzellen (Abb. 4.5 D links), dem Mukusvolumen pro Flächeneinheit der Membran (Abb. 4.5 D Mitte) und Volumen an intrazellulär gespeichertem Mukus pro Becherzelle (Abb. 4.5 D rechts), welche aufgrund der Streuung zwischen den verschiedenen Spendern jedoch nicht signifikant waren.

Weiterhin wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den ermittelten Werten der NHBEs und DHBEs nachgewiesen (Abb. 4.5).

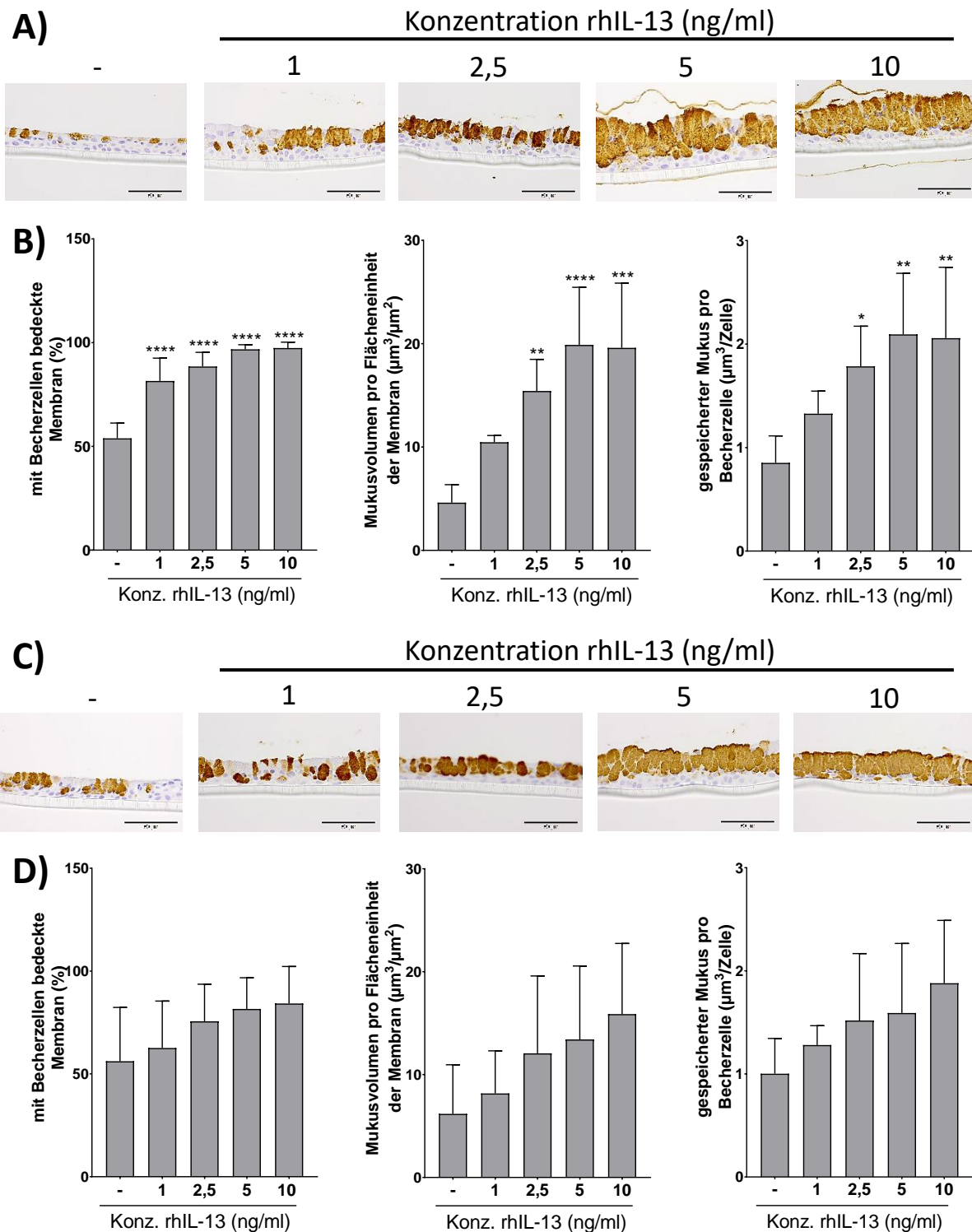


Abb. 4.5: rhIL-13-abhängige Zunahme an Becherzellen und intrazellulär gespeichertem Mukus in ALI-Epithelien von NHBECs und DHBECs. Zur Untersuchung der Th₂-charakteristischen Becherzellmetaplasie und Mukus-Hyperproduktion wurden immunhistochemische Färbung gegen MUC5AC in ALI-Epithelien von NHBECs **(A)** und DHBECs **(C)** durchgeführt. Zusätzlich wurde der Anteil der Membran, der mit Becherzellen bedeckt war, das Mukosvolumen pro Flächeneinheit und der gespeicherte Mukus pro Becherzelle mit PAS-gefärbten Schnitten von NHBECs **(B)** und DHBECs **(D)** quantitativ histologisch ermittelt. (A) & (C): Es sind jeweils ein Spender von je fünf exemplarisch gezeigt. Maßstabsbalken: 50 μm . (B) & (D): n = 5, MW \pm SD, One-Way ANOVA mit Dunnett's Post-Test (signifikant zur unstimulierten Kontrolle, * p < 0, 05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 & **** p < 0,0001).

4.1.3 Der TLR3-Ligand Poly(I:C) induziert eine antivirale Entzündungsreaktion in ALI-Epithelien von NHBEs

Da bereits gezeigt werden konnte, dass ALI-Zellkulturen von NHBEs den TLR3-Rezeptor exprimieren (Anhang Abb. A.1) und synthetisieren sowie das virale Surrogat Poly(I:C) die gleichen pro-inflammatorischen Gene und Interferone wie respiratorische Viren induziert (132, 160, 161), wurde Poly(I:C) als Trigger für eine antivirale Entzündungsreaktion *in vitro* im ALI-Zellkulturmodell gewählt. Somit wurde im nächsten Schritt die Wirkung des TLR3-Liganden Poly(I:C) auf ALI-Epithelien untersucht. Dafür wurde Poly(I:C) in den Endkonzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml mit dem basalen Differenzierungsmedium appliziert. Für die Untersuchung des Verlaufs der Entzündungsreaktion wurde eine Kinetik mit den Zeitpunkten 1 h, 3 h, 6 h, 12 h und 24 h als Messpunkte für die Stimulation mit Poly(I:C) gewählt, sowie eine unbehandelte Kontrolle (0 h) mitgeführt (Kap. 3.1.5, Abb. 3.3 B). Anschließend wurden verschiedene für eine Entzündung typische Gene analysiert und die Morphologie mithilfe von PAS-gefärbten Schnitten der ALI-Epithelien untersucht.

Als Nachweis, dass Poly(I:C) in ALI-Epithelien eine antivirale Entzündungsreaktion auslöst, wurde die mRNA von ALI-Zellkulturen der Kinetik isoliert, aufgereinigt und mithilfe der qRT-PCR analysiert (Kap. 3.2.1, Kap. 3.3.2, Kap. 3.3.3).

Für einen Nachweis der allgemeinen pro-inflammatorischen Antwort auf die Stimulation mit Poly(I:C) wurden die beiden Gene *TNF-α* und *IL-6* gemessen. Für beide Gene wurde eine dosis- und zeitabhängige Expression als Reaktion auf die Poly(I:C)-Behandlung nachgewiesen. Bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 1 µg/ml Poly(I:C) ergab sich für beide Gene erst bei einer 24-stündigen Inkubation eine höhere Expression als in der unbehandelten Kontrolle. Wurde eine Konzentration von 5 µg/ml Poly(I:C) eingesetzt, ergab sich eine einsetzende Hochregulierung der Genexpression ab einer drei-stündigen Stimulation mit Poly(I:C) (Tab. 4.1, Abb. 4.6 A). Die Genexpression von *TNF-α* zeigte die höchste Expression, wenn die ALI-Zellkulturen für 6 h mit Poly(I:C) inkubiert wurden. Anschließend sank die Genexpression wieder (Tab. 4.1, Abb. 4.6 A links). Die Genexpression von *IL-6* zeigte bei einer verwendeten Konzentration von 5 µg/ml Poly(I:C) einen ähnlichen Verlauf wie für *TNF-α*. Bei einer Inkubationszeit mit Poly(I:C) von mehr als 3 h wurde die Genexpression von *IL-6* stark hochreguliert und erreichte ihr Maximum nach 12-stündiger Behandlung. Im weiteren Verlauf nahm diese Genexpression wieder stark ab (Tab. 4.1, Abb. 4.6 A rechts). Sowohl für *TNF-α* als

auch *IL-6* erreichte die die Genexpression nach 24 h einen Wert, welcher mit einer eingesetzten Konzentration von 1 µg/ml Poly(I:C) vergleichbar war. Die höchste Genexpression dieser beiden pro-inflammatorischen Gene wurde für 10 µg/ml Poly(I:C) gemessen. Auch hier zeigte die Kinetik eine ansteigende Expression bis zu einer Inkubationsdauer von 6 h mit Poly(I:C) und nahm bei längeren Stimulationszeiten wieder ab (Tab. 4.1, Abb. 4.6 A).

Zusätzlich wurde noch die Genexpression des Typ I Interferons *IFN-β* und des Typ III Interferons *IFN-λ1* analysiert. Interferone spielen bei der frühen Phase der Abwehr von viralen Infektionen eine wichtige Rolle und verschieben das Gleichgewicht der Immunabwehr in Richtung der Th₁-dominierten Entzündungsreaktion (162, 163). Für beide Interferone wurde keine Genexpression bei einer Stimulation mit 1 µg/ml Poly(I:C) über den gesamten Zeitraum der Kinetik gemessen. Bei 5 µg/ml Poly(I:C) zeigte sich eine Änderung in der Genexpression (Tab. 4.1, Abb. 4.6 B). Die Expression von *IFN-β* stieg bis zu ihrem Maximum bei drei-stündiger Stimulation mit Poly(I:C) an und nahm im weiteren Verlauf wieder ab, sodass sie bei der längsten Behandlungsdauer von 24 h kaum mehr messbar war (Tab. 4.1, Abb. 4.6 B links). Die Genexpression für das Typ III Interferon *IFN-λ1* dagegen zeigte die höchste Genexpression bei einer Konzentration von 5 µg/ml Poly(I:C) und einer Inkubationszeit von 6 h (Tab. 4.1, Abb. 4.6 B rechts). Durch eine höhere Konzentration an Poly(I:C) (10 µg/ml) wurde die Expression beider Gene weiter verstärkt (Tab. 4.1, Abb. 4.6 B).

IP-10 ist ein durch Interferon-γ induziertes Gen, welches als chemotaktischer Lockstoff für aktivierte T-Lymphozyten zum entzündeten Gewebe gilt (164). Für *IP-10* wurde ein sehr ähnlicher Verlauf der Kinetik nachgewiesen wie für die vorher beschriebenen Gene. Bei einer Konzentration von 1 µg/ml Poly(I:C) veränderte sich die Genexpression kaum. Diese stieg jedoch dosis- und zeitabhängig an, sodass die höchste Expression bei einer Konzentration von 10 µg/ml Poly(I:C) nach 6 h nachgewiesen wurde. Bei längeren Inkubationszeiten mit Poly(I:C) nahm die Genexpression von *IP-10* wieder dosisabhängig ab (Tab. 4.1, Abb. 4.6 C).

Ein weiteres wichtiges Protein der inflammatorischen Antwort ist IL-8, welches Neutrophile zum entzündeten Gewebe rekrutiert (165). Auch für *IL-8* wurde eine Dosis- und Konzentrationsabhängigkeit zwischen Poly(I:C) und der Genexpression gefunden. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen gab es jedoch bei einer eingesetzten Konzentration von 1 µg/ml Poly(I:C) mit steigender Behandlungszeit einen stetigen Anstieg der Genexpression. Zusätzlich verschoben sich die Maxima für 5 µg/ml Poly(I:C) auf eine Inkubationszeit von 12 h und für 10 µg/ml Poly(I:C) ergab sich die höchste Genexpression bei einer Dauer von 24 h.

Somit waren für *IL-8* die Maxima im Vergleich zu den anderen gemessenen Genen in Richtung der längeren Inkubationszeiten verschoben (Tab. 4.2, Abb. 4.6 D & gesamt).

Tab. 4.1: Relative Genexpressionen von *TNF-α*, *IL-6*, *IFN-β*, *IFN-λ1*, *IP-10* und *IL-8* zur Charakterisierung einer antiviralen Entzündungsreaktion in einem *in vitro* Epithel. ALI-Zellkulturen von NHBEs wurden für 0 bis 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des viralen Surrogats Poly(I:C) (1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml Poly(I:C)) inkubiert. Anschließend wurde mittels qRT-PCR die Genexpression der entzündungsrelevanten Genen *TNF-α*, *IL-6*, *IFN-β*, *IFN-λ1*, *IP-10* und *IL-8* gemessen. n = 3, MW ± SD.

<i>TNF-α</i>	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
1 µg/ml Poly(I:C)	0,035 ± 0,039	0,088 ± 0,089	0,584 ± 0,457	0,213 ± 0,045	0,330 ± 0,084	1,397 ± 0,934
5 µg/ml Poly(I:C)	0,027 ± 0,025	0,111 ± 0,045	1,291 ± 0,648	5,883 ± 6,167	2,980 ± 2,876	1,368 ± 0,506
10 µg/ml Poly(I:C)	0,035 ± 0,039	0,176 ± 0,060	3,840 ± 2,445	15,216 ± 17,026	8,837 ± 5,529	5,770 ± 0,639
<i>IL-6</i>	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
1 µg/ml Poly(I:C)	0,022 ± 0,022	0,033 ± 0,033	0,334 ± 0,427	0,167 ± 0,163	3,367 ± 4,185	10,33 ± 2,53
5 µg/ml Poly(I:C)	0,028 ± 0,020	0,041 ± 0,034	1,219 ± 1,416	48,249 ± 70,897	64,653 ± 80,320	4,108 ± 1,543
10 µg/ml Poly(I:C)	0,022 ± 0,022	0,069 ± 0,047	5,670 ± 7,513	105,782 ± 146,000	88,900 ± 28,852	13,407 ± 5,853
<i>IFN-β</i>	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
1 µg/ml Poly(I:C)	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,00	0,109 ± 0,106	0,013 ± 0,015	0,010 ± 0,018	0,012 ± 0,007
5 µg/ml Poly(I:C)	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,003	1,124 ± 1,443	0,289 ± 0,301	0,062 ± 0,049	0,054 ± 0,025
10 µg/ml Poly(I:C)	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,001	3,821 ± 6,529	0,717 ± 1,089	0,098 ± 0,073	0,057 ± 0,072
<i>IFN-λ1</i>	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
1 µg/ml Poly(I:C)	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,091 ± 0,084	0,070 ± 0,068	0,306 ± 0,364	0,334 ± 0,412
5 µg/ml Poly(I:C)	0,000 ± 0,001	0,000 ± 0,000	0,985 ± 1,146	4,086 ± 4,006	3,187 ± 4,015	0,920 ± 0,916
10 µg/ml Poly(I:C)	0,000 ± 0,001	0,001 ± 0,001	3,414 ± 4,323	8,994 ± 10,247	5,827 ± 5,632	2,996 ± 1,806
<i>IP-10</i>	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
1 µg/ml Poly(I:C)	0,002 ± 0,002	0,001 ± 0,001	0,046 ± 0,039	1,001 ± 1,359	0,470 ± 0,657	0,888 ± 0,530
5 µg/ml Poly(I:C)	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,000	0,215 ± 0,275	9,082 ± 9,828	7,984 ± 11,163	2,343 ± 0,491
10 µg/ml Poly(I:C)	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,000	0,920 ± 1,247	13,861 ± 13,805	9,312 ± 9,581	7,269 ± 5,693
<i>IL-8</i>	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
1 µg/ml Poly(I:C)	0,032 ± 0,017	0,075 ± 0,059	0,320 ± 0,101	0,194 ± 0,072	0,424 ± 0,225	1,314 ± 0,241
5 µg/ml Poly(I:C)	0,002 ± 0,011	0,092 ± 0,048	0,443 ± 0,219	1,544 ± 1,661	2,761 ± 3,000	2,007 ± 0,306
10 µg/ml Poly(I:C)	0,032 ± 0,017	0,130 ± 0,028	1,154 ± 0,515	2,778 ± 2,382	4,514 ± 2,169	4,872 ± 1,657

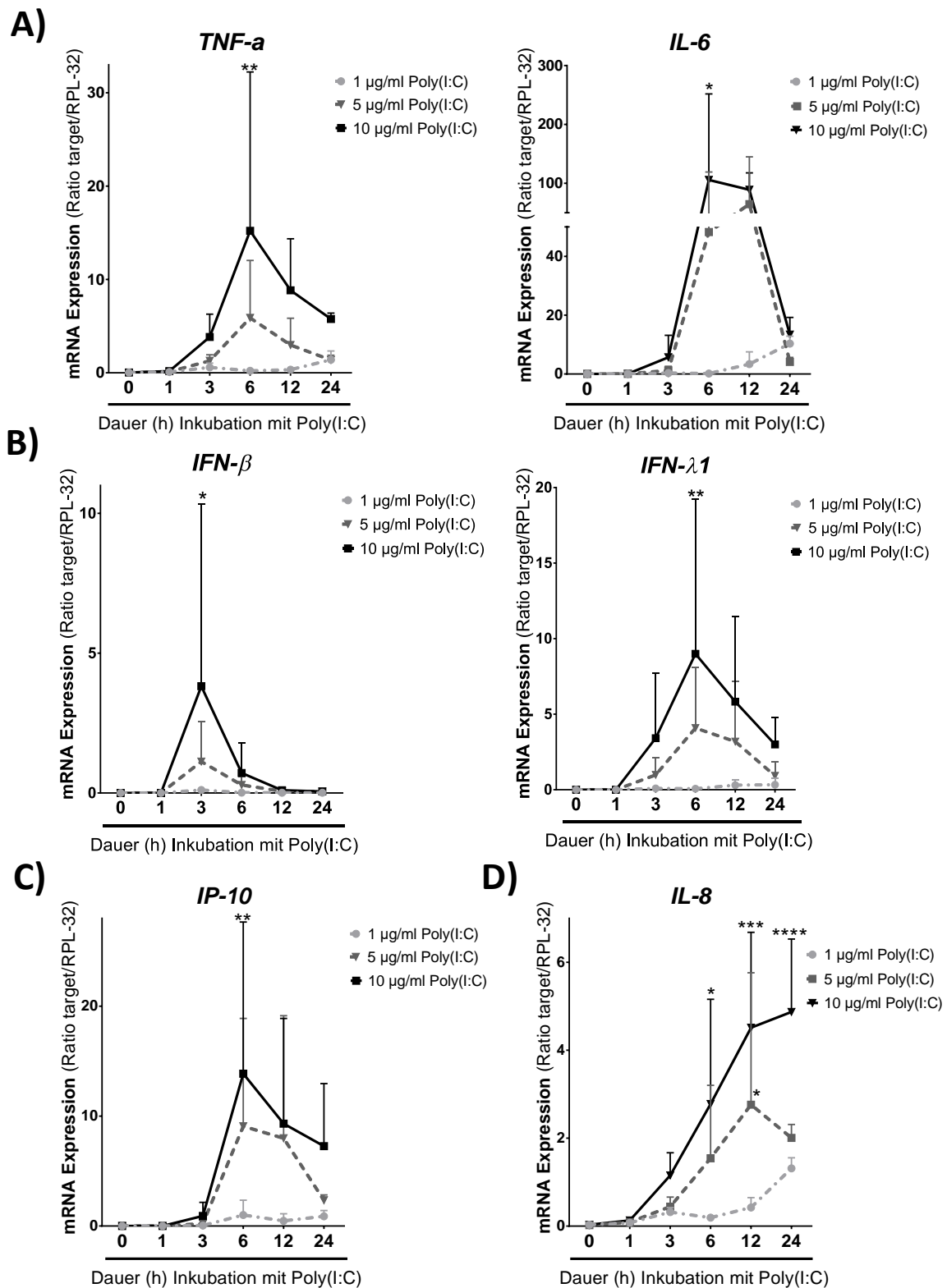


Abb. 4.6: Relative Genexpression entzündungsrelevanter Gene nach Poly(I:C)-Stimulation in ALI-Zellkulturen von NHBECS. ALI-Zellkulturen von NHBECS wurden für 0 bis 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des viralen Surrogats Poly(I:C) (1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml Poly(I:C)) inkubiert. Anschließend wurde mittels qRT-PCR die Genexpression der pro-inflammatorischen Genen *TNF- α* und *IL-6* (**A**), sowie der antiviralen Gene *IFN- β* und *IFN- λ* (**B**) und des Interferon-induzierten Gens *IP-10* (**C**) gemessen. Zusätzlich wurde die Expression des chemotaktischen Neutrophilen-Lockstoffs *IL-8* (**D**) ausgewertet. n = 3, MW \pm SD, Two-Way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparisons Post-Test (signifikant zur unstimulierten Kontrolle, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 & **** p < 0,0001).

Zusätzlich zur Expression verschiedener Gene wurde noch die Morphologie des ALI-Epithels hinsichtlich möglicher Effekte durch Poly(I:C) untersucht. Dazu wurden ALI-Präparate der Poly(I:C)-Kinetik mit der PAS-Methode gefärbt (Kap. 3.2.2).

In vitro Epithelien von NHBEs, die mit 1 µg/ml Poly(I:C) stimuliert wurden, wiesen nur leichte morphologische Veränderungen im Verlauf der Kinetik auf. Bis zu einer sechs-stündigen Inkubation veränderte sich das Verhältnis der PAS-positiv gefärbten Becherzellen an der apikalen Seite nicht und auch der darunterliegende Zellverband zeigte keine Unterschiede zur Kontrolle. Wurden die ALI-Epithelien für 12 h oder 24 h mit 1 µg/ml Poly(I:C) stimuliert, zeigten sich leichte Veränderungen in der Integrität des Zellverbandes. Zusätzlich war das Volumen der PAS-positiv gefärbten Mukusgranula der Becherzellen leicht reduziert (Abb. 4.7 A).

ALI-Zellkulturen, die mit 5 µg/ml Poly(I:C) behandelt wurden, wiesen bei einer Inkubationszeit von 1 h und 3 h keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle in PAS-gefärbten Paraffinschnitten auf. Bei einer sechs-stündigen Stimulation zeigte sich eine beginnende Abnahme des Volumens des gespeicherten Mukus. Bis zum nächsten untersuchten Zeitpunkt von 12 h Stimulation mit Poly(I:C) nahm der Anteil an Becherzellen und das Volumen an intrazellulärem Mukus deutlich ab. Dieser Effekt war auch bei einer Inkubationszeit von 24 h zu beobachten. Zusätzlich nahm die Integrität des Verbandes ab zwölf-stündiger Stimulation mit Poly(I:C) deutlich ab. Es bildeten sich Zwischenräume zwischen den einzelnen Basalzellen sowie den anderen Zellen des ALI-Epithels (Abb. 4.7 B).

Wurden ALI-Epithelien mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 µg/ml Poly(I:C) inkubiert, ergaben sich bei einer Inkubationsdauer von 1 h beziehungsweise 3 h keine morphologischen Veränderungen hinsichtlich des gespeicherten Mukusmaterials oder des Zellverbandes. Wie bei einer Konzentration von 5 µg/ml Poly(I:C), war eine Abnahme des Volumens des intrazellulären Mukus ab einer sechs-stündigen Inkubation zu beobachten. Diese Abnahme setzte sich bei längeren Stimulationszeiten mit Poly(I:C) fort, sodass für 12 h beziehungsweise 24 h kein gespeichertes Mukusmaterial in den Paraffinschnitten mehr nachgewiesen wurde. Zusätzlich nahm, wie schon für die zwei weiteren verwendeten Konzentrationen von Poly(I:C) beschrieben, die Integrität des Zellverbandes bei längeren Stimulationen mit Poly(I:C) ab (Abb. 4.7 C).

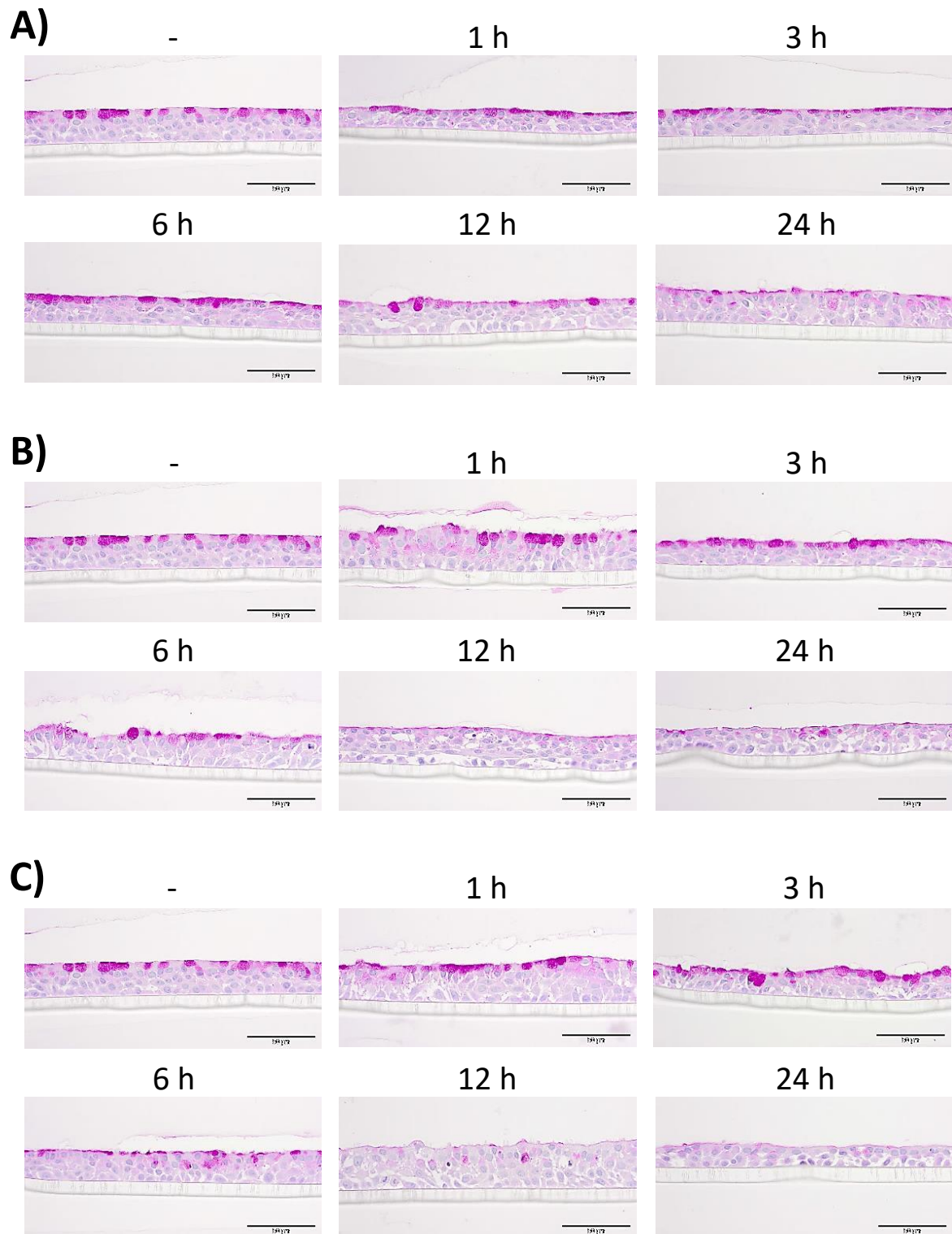


Abb. 4.7: Morphologie von ALI-Epithelien nach Poly(I:C)-Applikation. ALI-Zellkulturen von NHBECS wurden für bis zu 24 h mit dem viralen Surrogat Poly(I:C) inkubiert. Es wurden die Poly(I:C)-Konzentrationen 1 µg/ml Poly(I:C) (A), 5 µg/ml Poly(I:C) (B) und 10 µg/ml Poly(I:C) (C) eingesetzt. Es sind die PAS-Färbungen eines Spenders eines Experiments von insgesamt drei Spendern aus drei voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt. Maßstabsbalken: 50 µm.

4.1.4 Eine kombinierte Stimulation mit rhIL-13 und Poly(I:C) als *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation

Für die Untersuchung der frühen Phase einer Asthma-Exazerbation wurde in einem *in vitro* ALI-Zellkulturmodell mit humanen Bronchialepithelzellen die Behandlung mit rhIL-13 und Poly(I:C) kombiniert. ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBEs wurden von Tag 21 bis Tag 28 nach dem *Airlift* mit rhIL-13 behandelt. Es wurden dabei die Konzentrationen 2,5 ng/ml rhIL-13 beziehungsweise 5 ng/ml rhIL-13 zur Darstellung eines Th₂-polarisierten ALI-Phänotyps eingesetzt (Kap. 4.1.2). Ausgehend von den Ergebnissen der Poly(I:C)-Kinetik (Kap. 4.1.3) wurden die rhIL-13-behandelten ALI-Zellkulturen an Tag 28 für drei Stunden mit 5 µg/ml Poly(I:C) stimuliert (Kap. 3.1.5, Abb. 3.3 C). Anschließend wurde die Expression der Gene, die bereits durch rhIL-13 oder Poly(I:C) induziert wurden (Kap. 4.1.2, Kap. 4.1.3), untersucht. Kam es bei der kombinierten Stimulation zu einer deutlich verstärkten inflammatorischen Antwort des Epithels gegenüber den Einzelbehandlungen, wurde dies als *in vitro* nachgestellte Exazerbation gewertet. Weiterhin wurde die Morphologie analysiert.

Für die Charakterisierung des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation von NHBEs wurde zunächst die Genexpression verschiedener rhIL-13- und Poly(I:C)-induzierter Gene hinsichtlich einer verstärkten Expression mittels qRT-PCR (Kap. 3.3.3) untersucht.

Als erstes wurde die Genexpression von *MUC5AC* untersucht, welche bei einer Stimulation mit rhIL-13 stark hochreguliert wurde (Kap. 4.1.2, Abb. 4.4 A). Auch in diesem Experiment zeigte sich eine signifikante Induktion von *MUC5AC* im Vergleich zur Kontrolle, nachdem die ALI-Zellkulturen mit sowohl 2,5 ng/ml als auch 5 ng/ml rhIL-13 behandelt wurden. Poly(I:C) führte zu keiner Veränderung der Genexpression von *MUC5AC* bezogen auf die unstimulierte Kontrolle. Wurden die ALI-Epithelien der NHBEs zunächst mit rhIL-13 und dann mit Poly(I:C) inkubiert, ergab sich eine erhöhte Expression von *MUC5AC* ($1,56 \pm 0,53$ bzw. $2,00 \pm 0,70$) im Vergleich zur Kontrolle und der Poly(I:C)-Behandlung. Im Vergleich zu den rhIL-13-Behandlungen war diese Erhöhung jedoch nicht signifikant (Abb. 4.8 A links). Als zweites Gen zur Untersuchung des Einflusses des Th₂-polarisierten ALI-Epithels auf die nachgestellte Exazerbation wurde das Eotaxin *CCL26* gemessen. Wie schon zuvor für *MUC5AC*, ergab sich ein Anstieg der Genexpression nach rhIL-13-Behandlung ($5,54 \pm 4,42$ bzw. $12,27 \pm 4,24$) und keine Veränderung in der Genexpression, wenn nur mit Poly(I:C) stimuliert wurde. Die Genexpression von *CCL26* zeigte nach der kombinierten Stimulation mit sowohl rhIL-13 als auch Poly(I:C) eine minimale nicht signifikante Verstärkung für die Kombination aus 5 ng/ml

rhIL-13 und Poly(I:C) ($16,13 \pm 7,19$) im Vergleich zur Stimulation mit rhIL-13 alleine, während Poly(I:C) zusätzlich zu 2,5 ng/ml rhIL-13 keinen weiteren Anstieg ergab (Abb. 4.8 A rechts).

Für den Nachweis von allgemein pro-inflammatorischen Genen wurden wieder *TNF- α* und *IL-6* genauer analysiert. ALI-Zellkulturen von NHBECs, welche mit rhIL-13 behandelt wurden, zeigten keine Veränderung hinsichtlich der Genexpression von *TNF- α* im Vergleich zu den unstimulierten Proben. Durch die Stimulation mit Poly(I:C) ergab sich ein Anstieg der Expression von *TNF- α* ($2,31 \pm 1,63$), welcher durch die Kombination aus rhIL-13 und Poly(I:C) noch weiter verstärkt wurde. Wurden 2,5 ng/ml rhIL-13 mit 5 μ g/ml Poly(I:C) kombiniert ($8,10 \pm 4,31$) beziehungsweise 5 ng/ml rhIL-13 mit Poly(I:C) ($8,15 \pm 4,51$), ergab sich ein signifikanter Anstieg der Expression von *TNF- α* gegenüber der Behandlung mit rhIL-13 beziehungsweise Poly(I:C) alleine (Abb. 4.8 B links). Für *IL-6* wurde bei einer alleinigen Behandlung mit rhIL-13 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine ähnliche Expression gemessen. Nach der Poly(I:C)-Behandlung ergab sich ein nicht signifikanter Anstieg der Genexpression von *IL-6* ($1,06 \pm 0,76$), welcher durch die Kombination von rhIL-13 und Poly(I:C) zusammen weiter erhöht wurde ($5,15 \pm 3,79$ bzw. $3,75 \pm 2,21$) (Abb. 4.8 B rechts).

Als nächstes wurde das Interferon-induzierte Gen *IP-10* gemessen. Durch Stimulation allein mit rhIL-13 ergab sich keine Änderung hinsichtlich der Genexpression. Wie schon zuvor beschrieben (Kap. 4.1.3), ergab sich ein Anstieg der Expression von *IP-10* nach Inkubation mit Poly(I:C) ($0,15 \pm 0,14$). Wurden die Stimulationen mit rhIL-13 und Poly(I:C) nun zusammen durchgeführt, ergaben sich sowohl bei einer Konzentration von 2,5 ng/ml rhIL-13 mit 5 μ g/ml Poly(I:C) für 3 h ($0,49 \pm 0,36$) als auch 5 ng/ml rhIL-13 mit Poly(I:C) ($0,59 \pm 0,36$) eine signifikant erhöhte Genexpression von *IP-10* (Abb. 4.8 C).

Zusätzlich wurden noch die Interferone *IFN- β* und *IFN- λ 1* als wichtige Bestandteile der frühen antiviralen Antwort in *in vitro* Epithelien von NHBECs analysiert. Beide Gene zeigten nach Stimulation mit sowohl 2,5 ng/ml rhIL-13 als auch 5 ng/ml rhIL-13 alleine keinen Anstieg der relativen Genexpression. *IFN- β* wies nach der drei-stündigen Behandlung mit 5 μ g/ml Poly(I:C) alleine eine Erhöhung der Genexpression auf ($48,53 \pm 55,01$). Wurden nun die Stimulationen von rhIL-13 und Poly(I:C) entsprechend des experimentellen Aufbaus kombiniert, wurde eine stark erhöhte Genexpression für *IFN- β* gemessen ($254,1 \pm 189,9$ bzw. $325,5 \pm 195,8$) (Abb. 4.8 D links). Die gleichen Effekte wurden auch für die Genexpression von *IFN- λ 1*

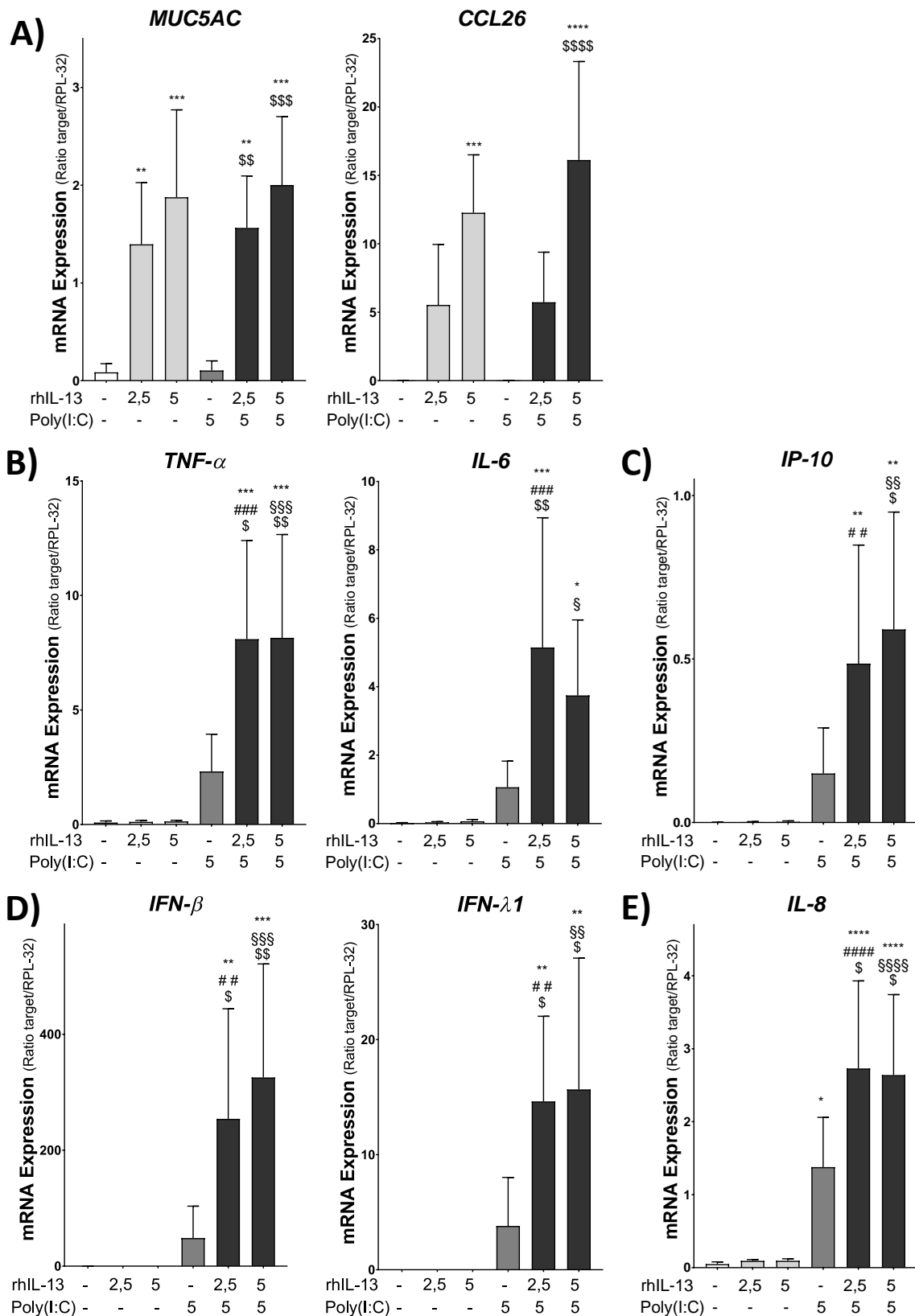


Abb. 4.8: Relative Expression ausgewählter Gene in ALI-Zellkulturen von NHBEs im *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation. ALI-Zellkulturen von NHBEs wurden von Tag 21 bis Tag 28 mit 2,5 ng/ml rhIL-13 bzw. 5 ng/ml rhIL-13 und/oder an Tag 28 für 3 h mit 5 µg/ml Poly(I:C) inkubiert. Anschließend wurde mittels qRT-PCR die Genexpression von *MUC5AC* und *CCL26* (A), *TNF-α* und *IL-6* (B), *IP-10* (C), *IFN-β* und *IFN-λ* (D) sowie *IL-8* (E) gemessen. n = 5, MW ± SD, One-Way ANOVA mit Dunnett's Post-Test (*signifikant zur unstimulierten Kontrolle mit * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 & **** p < 0,0001; # signifikant zu 2,5 ng/ml rhIL-13 mit ## p < 0,01, ### p < 0,001 & #### p < 0,0001; § signifikant zu 5 ng/ml rhIL-13 mit §§ p < 0,01, §§§ p < 0,001 & §§§§ p < 0,0001; § signifikant zu 5 µg/ml Poly(I:C) mit § p < 0,05, §§ p < 0,01, §§§ p < 0,001 & §§§§ p < 0,0001).

gemessen. Die relative Expression für dieses Gen lag in unstimulierten ALI-Epithelien von NHBEs, welche mit rhIL-13 alleine inkubiert worden waren, unterhalb beziehungsweise an der Grenze des Detektionslimits. Durch alleinige Stimulation mit Poly(I:C) ergab sich ein Anstieg der relativen Genexpression auf $3,81 \pm 4,22$. Diese Expression von *IFN- λ 1* wurde durch Kostimulation mit rhIL-13 und Poly(I:C) signifikant erhöht ($14,63 \pm 7,40$ bzw. $15,68 \pm 11,41$). (Abb. 4.8 D rechts).

Für die Charakterisierung des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation wurde außerdem die Genexpression von *IL-8* untersucht. Durch alleinigen Einsatz von Poly(I:C) wurde die Expression dieses Gens signifikant induziert ($1,38 \pm 0,68$). Entsprechend der bereits genannten analysierten Gene wurde eine zusätzlich erhöhte Genexpression von *IL-8* in kostimulierten ALI-Epithelien gemessen ($2,73 \pm 1,20$ bzw. $2,64 \pm 1,10$), wodurch sich signifikante Unterschiede zu den Einzelbehandlungen mit rhIL-13 beziehungsweise Poly(I:C) alleine ergaben (Abb. 4.8 E).

Aufgrund der Wirkung von Poly(I:C) auf die Zellverbandsintegrität bei langen Stimulationszeiten und hohen Konzentrationen, wurden zur Überprüfung der Morphologie der *in vitro* Epithelien von NHBEs ALI-Präparate angefertigt und diese mit der PAS-Methode gefärbt (Kap. 3.2.2). Hierbei zeigte sich in den unstimulierten Kontrollen ein pseudostratifiziertes Epithel, entsprechend der vorhergegangenen Untersuchungen (Abb. 4.9 oben links). Durch die Behandlung mit rhIL-13 ließ sich eine prozentuale Zunahme der Becherzellen erzielen, welche zusätzlich ein erhöhtes Volumen an intrazellulärem Mukusmaterial aufwiesen. Entsprechend der rhIL-13-Konzentrationsreihe war die Induktion des Mukusvolumens bei einer Konzentration von 5 ng/ml rhIL-13 stärker als bei der geringeren Konzentration (Abb. 4.9 oben mittig & rechts, Abb. 4.5). Durch den alleinigen Einsatz von 5 μ g/ml Poly(I:C) für 3 h ergaben sich keine morphologischen Veränderungen in Hinblick auf die Becherzellen und die Integrität des Zellverbandes (Abb. 4.9 unten links, Abb. 4.7 B). Wurden nun die beiden Behandlungen kombiniert, ergab sich bei einer Konzentration von 2,5 ng/ml rhIL-13 mit anschließender drei-stündiger Poly(I:C)-Stimulation ein ALI-Epithel mit ausschließlich Becherzellen an der apikalen Seite. Zusätzlich lag eine Schicht aus Mukus über den Zellen der Apikalseite. Weiterhin wies dieses Epithel jedoch keine Anzeichen von Zellverbandsschädigungen auf (Abb. 4.9 unten mittig). Wurden die ALI-Zellkulturen anstelle von 2,5 ng/ml rhIL-13 mit 5 ng/ml rhIL-13 vor der Poly(I:C)-Stimulation behandelt, wiesen die ALI-Epithelien die gleiche Morphologie wie bei der geringeren Konzentration auf: Es ergab sich

eine Zunahme in der Bedeckung mit Becherzellen und des Volumens an gespeichertem Mukus entsprechend der rhIL-13-Behandlung, mit einer Schicht aus Mukus an der apikalen Seite, ohne Veränderungen der Integrität des Zellverbandes (Abb. 4.9 unten rechts).

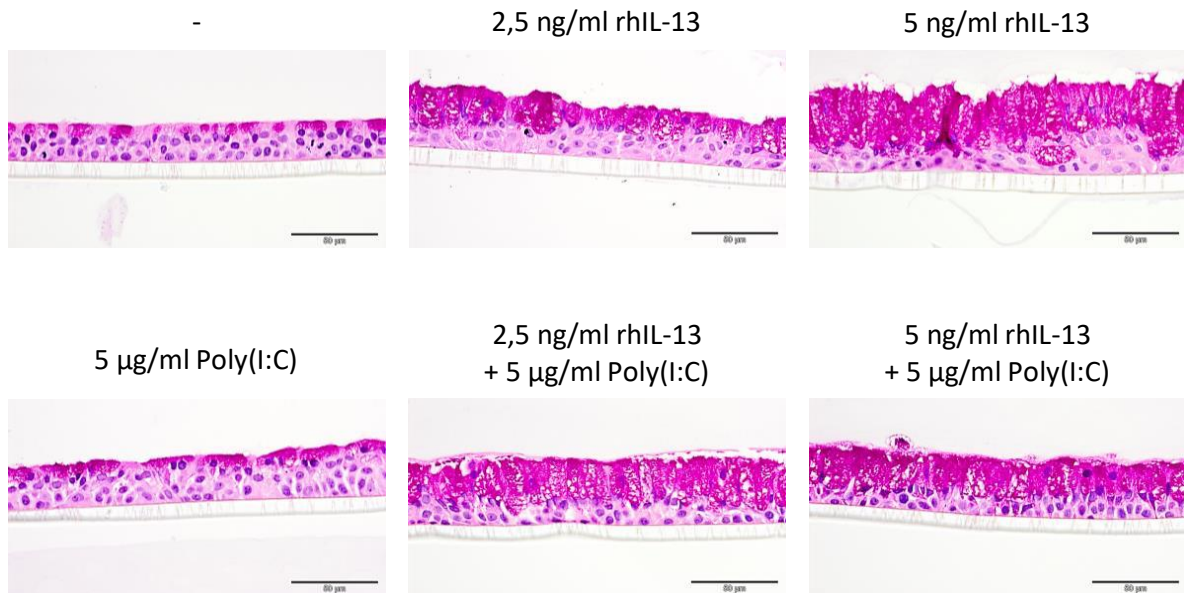


Abb. 4.9: Morphologie von ALI-Epithelien des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation von NHBECS. ALI-Zellkulturen von NHBECS wurden sieben Tage mit 2,5 ng/ml rhIL-13 bzw. 5 ng/ml rhIL-13 oder an Tag 28 für 3 h mit 5 µg/ml Poly(I:C) stimuliert. Für die Exazerbation wurden diese zwei Behandlungen kombiniert, sodass ALI-Zellkulturen von NHBECS zunächst von Tag 21 bis Tag 28 mit rhIL-13 behandelt wurden und an Tag 28 5 µg/ml Poly(I:C) für 3 h hinzugenommen wurde. Es sind die PAS-Färbungen eines Spenders eines Experiments von insgesamt fünf Spendern aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt. Maßstabsbalken: 50 µm.

Nachdem das *in vitro* Modell einer Exazerbation in ALI-Zellkulturen mit NHBECS untersucht und charakterisiert wurde, wurde das gesamte Experiment mit ALI-Zellkulturen der DHBECS wiederholt (Kap. 3.1.5, Abb. 3.3 C). Es wurden zunächst die Induktion der gleichen Gene, wie zuvor bei der Untersuchung der ALI-Epithelien der NHBECS, mittels qRT-PCR gemessen (Kap. 3.3.3).

Die Genexpression des Hauptmuzins *MUC5AC* wurde durch Stimulation mit rhIL-13 induziert ($1,63 \pm 1,87$ bzw. $3,54 \pm 5,43$). Die Antwort auf die rhIL-13-Behandlung in Bezug auf die Genexpression nahm durch die zusätzliche Stimulation mit 5 µg/ml Poly(I:C) für 3 h an Tag 28 nicht weiter zu (Abb. 4.10 A links). Die Genexpression des Eotaxins *CCL26* zeigte nur bei einer Stimulation mit 5 ng/ml rhIL-13 alleine ($18,01 \pm 14,36$) und in Kombination mit Poly(I:C) ($18,71 \pm 12,36$) einen signifikanten Anstieg der Genexpression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 4.10 A rechts).

Die beiden gemessenen pro-inflammatorischen Gene *TNF- α* und *IL-6* wiesen die höchste Expression bei der kombinierten Stimulation mit rhIL-13 und anschließender Poly(I:C)-Behandlung auf. Entsprechend ihrer Funktion und der bisherigen Ergebnisse ergab sich keine Änderung der Genexpression beider Gene durch Inkubation mit rhIL-13 alleine. Durch Poly(I:C) wurde eine signifikante Induktion der Expression von *TNF- α* ($4,66 \pm 2,38$) gemessen. Diese erhöhte Expression wurde durch eine vorherige Stimulation mit rhIL-13 gegenüber den Einzelbehandlungen weiter gesteigert ($13,22 \pm 5,48$ bzw. $17,45 \pm 7,75$) (Abb. 4.10 B links). Die Expression von *IL-6* hingegen wies bei einer Konzentration von 2,5 ng/ml rhIL-13 in Kombination mit Poly(I:C) eine signifikant erhöhte Genexpression ($15,22 \pm 18,74$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und entsprechenden rhIL-13-Konzentration alleine auf (Abb. 4.10 B rechts).

Der chemotaktische Lockstoff IP-10 zeigte die gleiche Antwort auf die verschiedenen Stimuli wie IL-6 in Bezug auf die Genexpression. Nur durch Poly(I:C) alleine ($0,66 \pm 0,79$) oder in Kombination mit rhIL-13 ergab sich ein Anstieg der Genexpression von *IP-10* ($1,77 \pm 1,06$ bzw. $1,52 \pm 0,74$) (Abb. 4.10 C).

Als nächstes wurde die antivirale Interferonantwort durch Messung der Genexpression der beiden Interferone *IFN- β* und *IFN- $\lambda 1$* untersucht. Beide Gene zeigten dabei in Hinblick auf die Genexpression die gleiche Antwort auf die Stimuli rhIL-13 und Poly(I:C). Wie bereits in der Poly(I:C)-Kinetik und der Exazerbation mit ALI-Zellkulturen von NHBEs gezeigt, wiesen die ALI-Epithelien der DHBECs bei einer Stimulation nur mit rhIL-13 alleine keine Induktion der Expression auf, reagierten aber auf Poly(I:C) alleine (*IFN- β* : $115,1 \pm 134,3$; *IFN- $\lambda 1$* : $5,43 \pm 9,65$). Die Genexpression dieser Gene wurde durch die Kombination von rhIL-13 und Poly(I:C) weiter gesteigert (*IFN- β* : $828,60 \pm 678,3$ bzw. $585,6 \pm 474,00$; *IFN- $\lambda 1$* : $21,18 \pm 14,19$ bzw. $20,71 \pm 15,06$) (Abb. 4.10 D).

Als letztes wurde die Genexpression von *IL-8* zur Charakterisierung des *in vitro* Modells der Asthma-Exazerbation mit ALI-Zellkulturen von DHBECs gemessen. Die Antwort der Expression von *IL-8* verhielt sich dabei ähnlich, wie bereits für die vorherigen Gene der Immunantwort beschrieben. Allerdings war für *IL-8* die Streuung zwischen den Reaktionen der einzelnen Spender in den kombinierten Behandlungen so groß, dass keine signifikanten Unterschiede ermittelt wurden (Abb. 4.10 E).

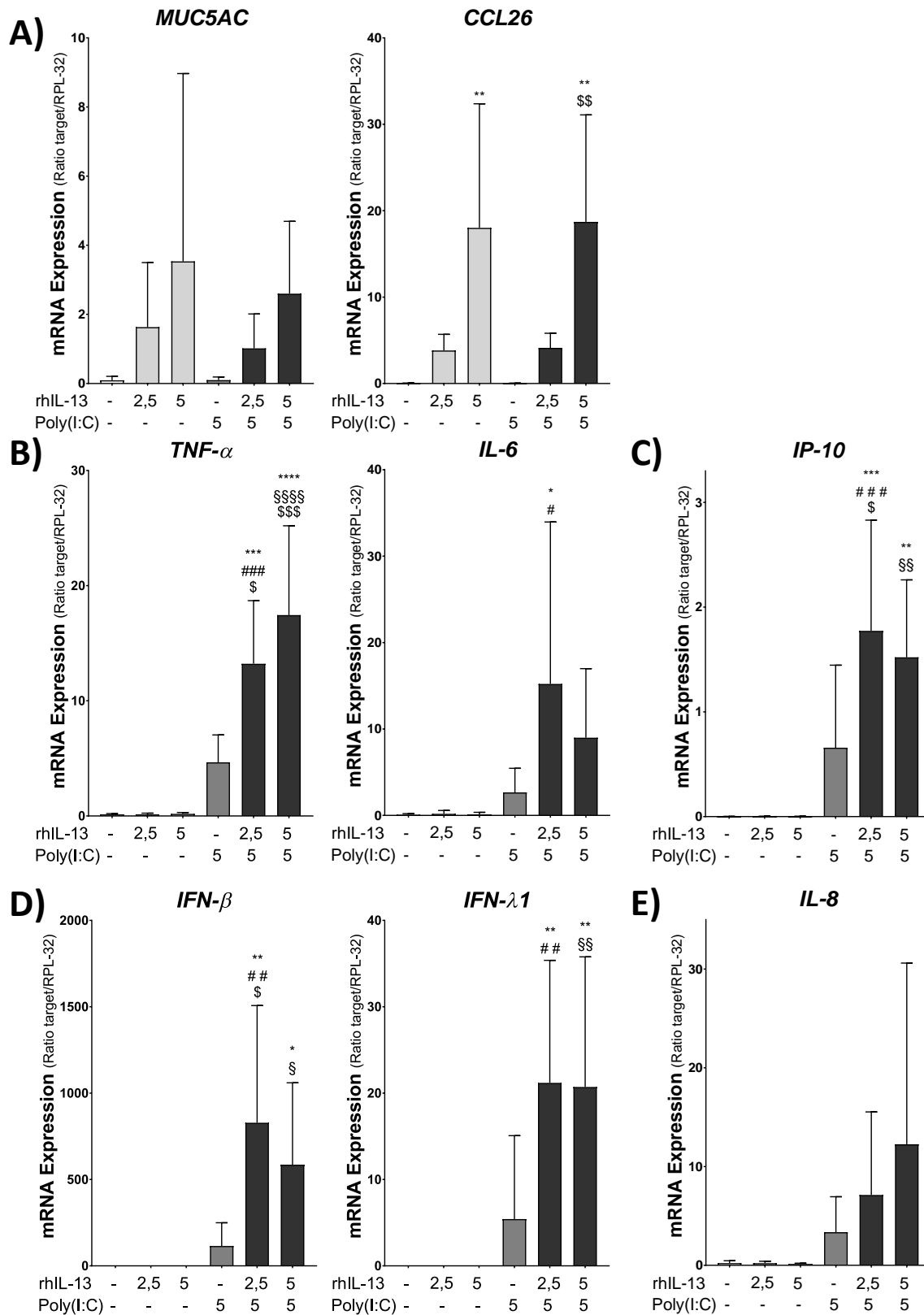


Abb. 4.10: Relative Expression ausgewählter Gene in ALI-Zellkulturen von DHBECs im *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation. ALI-Zellkulturen von DHBECs wurden von Tag 21 bis Tag 28 mit 2,5 ng/ml rhIL-13 bzw. 5 ng/ml rhIL-13 und anschließend an Tag 28 für 3 h mit 5 µg/ml Poly(I:C) zur Untersuchung einer *in vitro* Exazerbation inkubiert. Anschließend wurde mittels qRT-PCR die Genexpression von *MUC5AC* und *CCL26* (A), *TNF-α* und *IL-6* (B), *IP-10* (C), *IFN-β* und *IFN-λ* (D) und *IL-8* (E) gemessen. n = 5, MW ± SD, One-Way ANOVA mit Dunnett's Post-Test (*signifikant zur unstimulierten Kontrolle mit * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 & **** p < 0,0001; # signifikant zu 2,5 ng/ml rhIL-13 mit # p < 0,05, ## p < 0,01 & ### p < 0,001; § signifikant zu 5 ng/ml rhIL-13 mit § p < 0,05, §§ p < 0,01 & §§§ p < 0,001; § signifikant zu 5 µg/ml Poly(I:C) mit § p < 0,05, §§ p < 0,01 & §§§ p < 0,001).

Zusätzlich zur Genexpression wurde auch die Morphologie der ALI-Epithelien von DHBECS untersucht, die mit sowohl rhIL-13 als auch Poly(I:C) entsprechend des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation behandelt wurden. Dazu wurden Paraffinschnitte der *in vitro* Epithelien angefertigt, die anschließend mit der PAS-Methode gefärbt (Kap. 3.2.2) und visuell ausgewertet wurden. Entsprechend der bisherigen Ergebnisse zeigten gefärbte ALI-Präparate ohne Stimulation ein pseudostratifiziertes Epithel mit etwas mehr als 50 % Bedeckung durch Becherzellen an der apikalen Seite (Abb. 4.11 oben links). Durch Stimulation mit rhIL-13 ergab sich ein Th₂-polarisiertes Epithel mit einer konzentrationsabhängigen Zunahme des Anteils der Becherzellen und Volumen des gespeicherten Mukusmaterials (Abb. 4.11 oben mittig & rechts). Durch den Einsatz von Poly(I:C) wurden keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet (Abb. 4.11 unten links). Bei einer eingesetzten Konzentration von 2,5 ng/ml rhIL-13 in Kombination mit Poly(I:C) ergab sich eine leichte Abnahme des intrazellulären Mukus im Vergleich zum ALI-Epithel, welches nur mit 2,5 ng/ml rhIL-13 behandelt wurde. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war der Anteil an Becherzellen und das Volumen des darin gespeicherten Mukus erhöht. Es konnte allerdings auch eine dünne Schicht an Mukus an der apikalen Seite beobachtet werden. Morphologische

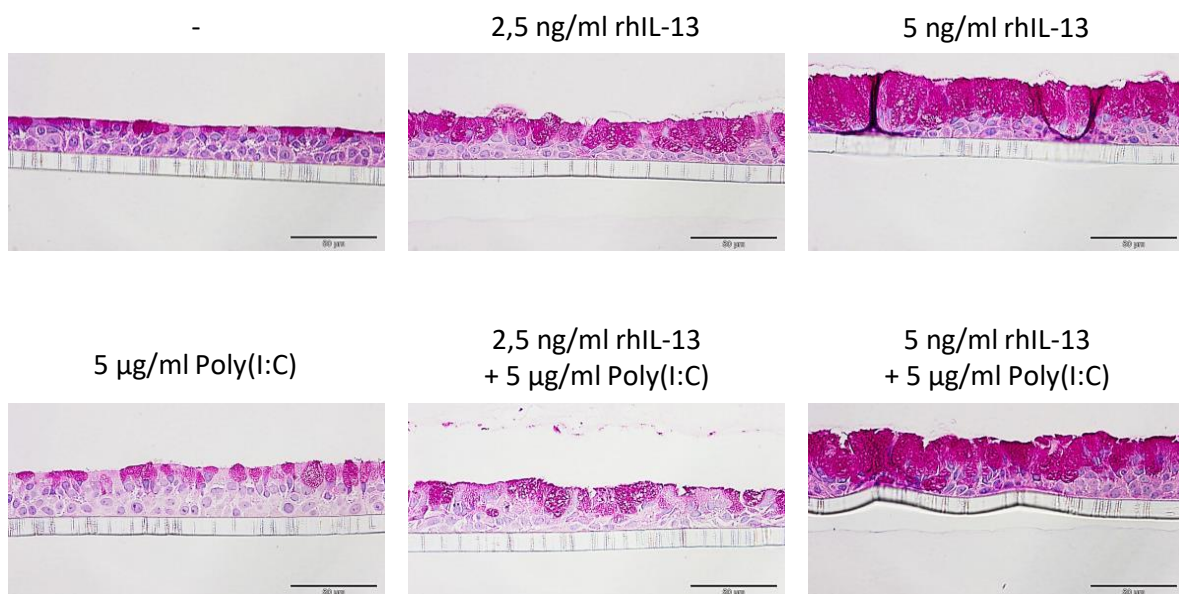


Abb. 4.11: Morphologie von ALI-Epithelien des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation von DHBECS. ALI-Zellkulturen von DHBECS wurden sieben Tage mit 2,5 ng/ml rhIL-13 bzw. 5 ng/ml rhIL-13 oder an Tag 28 für 3 h mit 5 µg/ml Poly(I:C) stimuliert. Für das Modell der Exazerbation wurden diese zwei Behandlungen kombiniert, sodass ALI-Zellkulturen von DHBECS zunächst von Tag 21 bis Tag 28 mit rhIL-13 behandelt wurden und an Tag 28 Poly(I:C) für 3 h hinzugenommen wurde. Es sind die PAS-Färbungen eines Spenders eines Experiments von insgesamt fünf Spendern aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt. Maßstabsbalken: 50 µm.

Veränderungen wie zum Beispiel Schädigung der Zellverbandsintegrität waren nicht erkennbar (Abb. 4.11 unten mittig). Wurden statt 2,5 ng/ml rhIL-13 5 ng/ml rhIL-13 in Kombination mit Poly(I:C) eingesetzt, wiesen die gefärbten Paraffinschnitte dieser ALI-Zellkulturen die gleiche Morphologie wie bei der geringeren eingesetzten Konzentration an rhIL-13 auf (Abb. 4.11 unten rechts).

Um mögliche Unterschiede zwischen ALI-Epithelien von NHBEs und DHBECs im *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation zu untersuchen, wurden anschließend die relativen Genexpressionen der zuvor gemessenen Gene einander gegenübergestellt (Tab. 4.2, Abb. 4.12).

Die beiden durch rhIL-13 induzierten Gene *MUC5AC* und *CCL26* wiesen eine geringere relative Expression in Proben von DHBECs im Vergleich zu den NHBEs während der Exazerbation mit 2,5 ng/ml rhIL-13 auf. Wohingegen bei einer Kombination von 5 ng/ml rhIL-13 mit 5 µg/ml Poly(I:C) die Genexpression von *MUC5AC* und *CCL26* in ALI-Zellkulturen von DHBECs höher war als in ALI-Kulturen von NHBEs, wenn auch nicht signifikant (Tab. 4.2, Abb. 4.12 A). Für alle weiteren untersuchten Gene wurde ein erhöhter Mittelwert für die Genexpression in ALI-Zellkulturen von DHBECs gegenüber NHBEs ermittelt, jedoch war dieser Effekt aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität oftmals nicht signifikant (Tab. 4.2, Abb. 4.12). 5 ng/ml rhIL-13 in Kombination mit Poly(I:C) war hinsichtlich der Expression von *TNF-α* signifikant in

Tab. 4.2: Vergleich der relativen Genexpressionen von *TNF-α*, *IL-6*, *IFN-β*, *IFN-λ1*, *IP-10* und *IL-8* in ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBECs im *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation. ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBECs wurden für sieben Tage mit 2,5 ng/ml rhIL-13 bzw. 5 ng/ml rhIL-13 und an Tag 28 für 3 h zusätzlich mit 5 µg/ml Poly(I:C) stimuliert. Anschließend wurde mittels qRT-PCR die Genexpression von *MUC5AC*, *CCL26*, *TNF-α*, *IL-6*, *IFN-β*, *IFN-λ1*, *IP-10* und *IL-8* gemessen. n = 5, MW ± SD.

Gen	2,5 ng/ml rhIL-13 & 5 µg/ml Poly(I:C)		5 ng/ml rhIL-13 & 5 µg/ml Poly(I:C)	
	NHBEs	DHBECs	NHBEs	DHBECs
<i>MUC5AC</i>	1,56 ± 0,53	1,02 ± 1,00	2,00 ± 0,70	2,60 ± 2,10
<i>CCL26</i>	5,73 ± 3,66	4,12 ± 1,69	16,13 ± 7,19	18,71 ± 12,38
<i>TNF-α</i>	8,09 ± 4,31	13,22 ± 5,48	8,15 ± 4,51	17,45 ± 7,75
<i>IL-6</i>	5,15 ± 3,79	15,22 ± 18,74	3,75 ± 2,21	8,99 ± 8,00
<i>IP-10</i>	0,49 ± 0,36	1,77 ± 1,06	0,59 ± 0,36	1,52 ± 0,74
<i>IFN-β</i>	254,1 ± 189,8	828,6 ± 678,3	325,5 ± 195,8	585,6 ± 474,0
<i>IFN-λ1</i>	14,63 ± 7,40	21,18 ± 14,19	15,68 ± 11,41	20,71 ± 15,06
<i>IL-8</i>	2,73 ± 1,20	7,12 ± 8,41	2,64 ± 1,10	12,26 ± 18,34

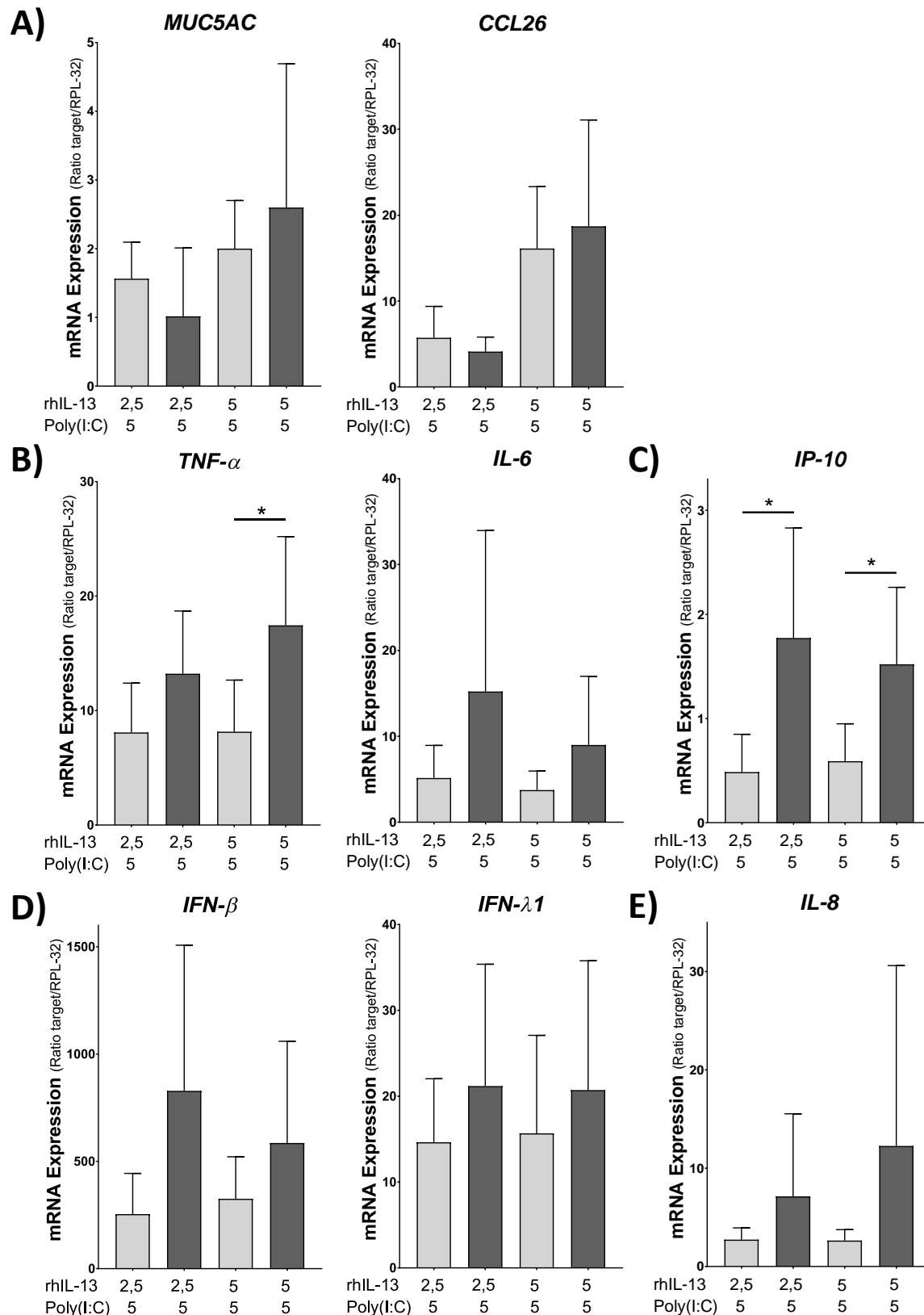


Abb. 4.12: Vergleich der relativen Expression rhIL-13- und Poly(I:C)-induzierter Gene in ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBEs im *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation. ALI-Zellkulturen von NHBEs (hellgrau) und DHBEs (dunkelgrau) wurden von Tag 21 bis Tag 28 mit 2,5 ng/ml rhIL-13 bzw. 5 ng/ml rhIL-13 und anschließend an Tag 28 für 3 h mit 5 µg/ml Poly(I:C) zur Untersuchung einer *in vitro* Exazerbation inkubiert. Anschließend wurde mittels qRT-PCR die Genexpression von *MUC5AC* und *CCL26* (A), *TNF-α* und *IL-6* (B), *IP-10* (C), *IFN-β* und *IFN-λ* (D) und *IL-8* (E) gemessen. n = 5, MW ± SD, Unpaired t-Test (*signifikant zu entsprechender Stimulation der NHBEs mit * p < 0,05).

DHBECs gegenüber NHBECs erhöht (Tab. 4.2, Abb. 4.12 B). Auch das Gen *IP-10* war in ALI-Zellkulturen von DHBECs bei gleichen Stimulationen gegenüber der relativen Genexpression in differenzierten Epithelien von NHBECs signifikant erhöht (Tab. 4.2, Abb. 4.12 C).

Hinsichtlich der Morphologie wurden keine Unterschiede zwischen den ALI-Präparaten von NHBECs und DHBECs, welche *in vitro* die Asthma-Exazerbation nachstellten, beobachtet (Abb. 4.9 & Abb. 4.11).

4.2 Untersuchung des Transkriptoms von NHBECs und DHBECs

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Gesamt-Transkriptome von ALI-Zellkulturen von NHBECs sowie DHBECs, die mit rhIL-13 oder Poly(I:C) beziehungsweise deren Kombination stimuliert wurden, in einem von den oben beschriebenen Experimenten unabhängigen Versuchsansatz erstellt. Mithilfe von Microarrays (Kap. 3.3.5) wurden die Proben hinsichtlich veränderter Genexpressionsmuster, ausgelöst durch die verschiedenen Stimuli, untersucht. Dazu wurden zunächst die gemessenen Expressionsintensitäten transformiert und anschließend der *Fold Change* zwischen der Stimulation und der unstimulierten Kontrolle für jedes Gen berechnet (Kap. 3.3.5). Für die Analyse, welche Wirkung die Stimulation auf ALI-Epithelien von NHBECs und DHBECs hatten, wurden die 100 Gene, mit dem höchsten *Fold Change* ermittelt und in einer *Heat Map* dargestellt (Kap. 3.3.5, Anhang Abb. A2 bis A7). Durch die Begrenzung auf 100 Gene wurde ein erster Eindruck der Regulation, der am stärksten veränderten Genexpressionen erhalten, welche zusätzlich ein eindeutiges Clustering entsprechend der Behandlung und der unstimulierten Kontrolle aufwiesen (Anhang Abb. A2 bis A7). Für die weitere detaillierte Analyse der am stärksten veränderten Gene und deren möglicher Zusammenhang bei Asthma, der inflammatorischen Antwort oder einer Asthma-Exazerbation wurde sich in dieser Arbeit auf die 25 am stärksten regulierten Gene von NHBECs und DHBECs begrenzt. Aufgrund der teilweise deutlichen Unterschiede zwischen NHBECs und DHBECs bei den Werten der *Fold Changes* einzelner Gene, wurde sich für eine Grenze anhand der Anzahl an Genen zur Bewertung der verschiedenen *in vitro* Modelle für die Untersuchung einer Asthma-Exazerbation entschieden.

4.2.1 Stimulation eines ALI-Epithels mit rhIL-13 führt zu einer stark erhöhten Expression von *CLCA1*

Nachdem gezeigt wurde, dass durch die Stimulation mit rhIL-13 ALI-Epithelien von NHBEs sowie DHBECs einen Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyp ausbilden (Kap. 4.1.2), wurde das Gesamt-Transkriptom dieses Phänotyps untersucht. Dazu wurden Genexpressionsprofile von unstimulierten ALI-Kulturen von NHBEs und DHBECs sowie von ALI-Kulturen, die mit 5 ng/ml rhIL-13 von Tag 21 bis Tag 28 behandelt wurden, erstellt und der *Fold Change*, sprich der Unterschied der Genexpression zwischen rhIL-13-behandelten Proben und unstimulierten Proben ermittelt (Kap. 3.1.5, Kap. 3.3.5).

Die Datensätze der Microarrays zeigten nach Stimulation mit rhIL-13 eine große Anzahl an Genen, die im Vergleich zu den unstimulierten Proben eine veränderte Regulation zeigten. Aufgrund der großen Anzahl an gemessenen Genen (mehr als 20.800), wurde sich bei der weiteren Auswertung auf die Gene konzentriert, die nach rhIL-13-Stimulation in ihrer Expression am stärksten verändert waren. In einem ersten Überblick wurden die 100 Gene mit den höchsten beziehungsweise niedrigsten *Fold Changes* betrachtet. Von diesen 100 Kandidaten wiesen die ALI-Epithelien von NHBEs 77 Gene mit einem positiven Wert auf, sprich sie zeigten eine induzierte Expression nach der Stimulation mit rhIL-13. Die verbleibenden 23 Gene dagegen wurden durch die Behandlung mit rhIL-13 stark herunter reguliert (Anhang Abb. A.2). Von den 100 am stärksten regulierten Genen von ALI-Zellkulturen der DHBECs wurden 88 induziert und 12 Gene herunter reguliert (Anhang Abb. A.3).

Sowohl für die Expressionsintensitäten der ALI-Zellkulturen von NHBEs als auch DHBECs ergab sich ein deutliches Clustering der Expressionsintensitäten aufgetrennt entsprechend der Behandlung. Allerdings zeigten sich spenderabhängige Streuungen vor allem für die DHBECs. So zeigten die Spender H und K zum Beispiel eine geringere Induktion von einigen Genen in der rhIL-13-stimulierten Gruppe als die anderen drei Spender (Anhang Abb. A.2, Abb. A.3).

Um die Wirkung vom rhIL-13 auf die ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBECs zu untersuchen, wurde der *Fold Change* der rhIL-13-Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Proben berechnet und die 25 Kandidaten mit den stärksten Veränderungen genauer betrachtet (Tab. 4.3). Die stärkste Geninduktion in ALI-Zellkulturen von NHBEs wies das Gen *CST1* mit einem *Fold Change* von 635 auf, gefolgt von *CLCA1* mit 238, *CST4* mit 70 und *FETUB* mit 62

(Tab. 4.3 A). Diese Gene waren auch in den ALI-Zellkulturen von DHBECS am stärksten hochreguliert (Tab. 4.3 B). Insgesamt unterschieden sich die 25 am stärksten regulierten Gene der ALI-Kulturen von NHBECS kaum von den Ergebnissen der DHBECS. Neben den vier Genen, mit dem höchsten *Fold Change*, waren 19 Gene dieser Auflistung sowohl unter den 25

Tab. 4.3: Die 25 Gene mit den höchsten *Fold Changes* in rhIL-13-behandelten ALI-Zellkulturen von NHBECS und DHBECS. ALI-Zellkulturen von NHBECS (A) und DHBECS (B) wurden von Tag 21 bis Tag 28 mit 5 ng/ml rhIL-13 stimuliert. Anschließend wurden Microarrays (ATLAS Biolabs, Berlin DE) dieser Proben durchgeführt und aus den Expressionsintensitäten die jeweiligen *Fold Changes* mit den unstimulierten entsprechenden Proben als Kontrolle berechnet. n = jeweils 5, *Fold Change Cut off* 2, p-Wert < 0,05.

A) NHBECS				B) DHBECS			
	Genname	<i>Fold Change</i>	p-Value		Genname	<i>Fold Change</i>	p-Value
1)	CST1	634,79	4,93e-09	1)	CST1	392,67	2,79e-08
2)	CLCA1	238,42	1,72e-07	2)	CLCA1	63,36	2,45e-04
3)	CST4	69,69	1,26e-09	3)	CST4	59,67	8,20e-07
4)	FETUB	61,88	1,16e-04	4)	FETUB	48,61	2,64e-04
5)	PRB1	42,35	1,30e-08	5)	POSTN	25,94	1,84e-04
6)	SH2D1B	40,64	1,16e-06	6)	DPP4	22,75	1,11e-04
7)	DPP4	36,23	1,12e-06	7)	NOS2	17,59	3,53e-05
8)	CCL26	34,36	8,09e-08	8)	CD36	15,23	2,15e-05
9)	ITLN1	33,32	7,29e-03	9)	LRRC31	14,11	1,52e-06
10)	CYTIP	31,32	7,29e-03	10)	SH2D1B	14,00	3,27e-05
11)	FAM177B	29,90	2,35e-06	11)	VSIG1	13,80	4,77e-05
12)	POSTN	29,18	1,89e-07	12)	FAM177B	13,42	1,28e-02
13)	NOS2	28,78	3,14e-08	13)	PRB1	12,43	1,27e-02
14)	PRB2	26,73	1,17e-06	14)	SERPINB10	11,45	1,15e-04
15)	VSIG1	23,15	2,08e-08	15)	CYTIP	11,40	5,64e-03
16)	SLC26A4	19,70	9,46e-04	16)	SLC26A4	11,17	7,51e-04
17)	TSPAN8	18,56	1,38e-07	17)	MUC5AC	10,61	7,27e-05
18)	LRRC31	17,47	7,78e-05	18)	FCGBP (unmapped)	10,39	1,01e-05
19)	CD36	15,48	1,29e-04	19)	TSPAN8	10,33	4,25e-06
20)	SLC9B2	14,31	9,07e-06	20)	CST2	10,26	1,45e-04
21)	FCGBP (unmapped)	13,39	4,10e-06	21)	SLC9B2	9,76	1,17e-04
22)	SERPINB10	12,60	2,72e-05	22)	CCL26	9,71	6,76e-04
23)	MUC5AC	12,30	7,70e-06	23)	PRB2	9,16	1,37e-02
24)	SLC5A8	12,16	1,41e-05	24)	SLC5A8	8,77	3,93e-05
25)	FCGBP	10,95	1,86e-06	25)	CAPN14	8,60	2,26e-04

Kandidaten der Expressionsergebnisse für die NHBEs als auch DHBEs zu finden. Die Gene *PRB1*, *SH2D1B*, *CCL26*, *CYTIP*, *FAM177B*, *PRB2*, *SLC26A4*, *TSPAN8* und *SLC9B2* wiesen dabei in den Ergebnissen der ALI-Zellkulturen von NHBEs einen höheren *Fold Change* (zwischen 42 und 14) auf, als die ALI-Epithelien der DHBEs (*Fold Changes* zwischen 14 und 9,2). Dagegen waren die Gene *POSTN*, *DPP4*, *NOS2*, *CD36*, *LRRC31*, *VSIG1*, *SERPINB10*, *MUC5AC*, *FCGBP* in den Datensätzen der DHBEs (zwischen Platz 5 und 20) im Vergleich zu den Ergebnissen der NHBEs (zwischen Platz 7 und 23) besser platziert, zeigten jedoch geringere Werte für den *Fold Change*. Jeweils zwei Gene der 25 Kandidaten waren unter den Ergebnissen der DHBEs beziehungsweise der NHBEs nicht vertreten. Während *ITLN1* unter den Top 25 der NHBEs mit einem *Fold Change* von 33 vertreten war, waren die Expressionslevel für die ALI-Zellkulturen der DHBEs für dieses Gen mit einem p-Wert von 0,059 nicht signifikant verändert (*Fold Change* 11). *FCGBP*, welches in den Ergebnissen der NHBEs unter den 25 Kandidaten an letzter Stelle aufgeführt wurde, wies einen *Fold Change* von 7,8 auf und war bei den Daten der DHBEs auf Platz 27. Die bei den DHBEs aufgelisteten Gene *CST2* und *CAPN14* waren bei den NHBEs an Stelle 28 (*Fold Change* 7,5) und 30 (*Fold Change* 6,5) der am stärksten regulierten Gene vertreten (Tab. 4.3).

4.2.2 Poly(I:C) induziert eine erhöhte Expression von *CXCL10*, *CCL20* und *OASL*

Entsprechend der Untersuchung der Wirkung von rhIL-13 auf das Transkriptom von ALI-Epithelien von NHBEs und DHBEs, wurden auch Veränderungen auf Genexpressionsebene durch das virale Surrogat Poly(I:C) analysiert. Dazu wurden Zellkulturen von fünf lungen-gesunden Spendern beziehungsweise fünf asthmatischen Spendern für 28 Tage unter ALI-Bedingungen kultiviert und an Tag 28 für 3 h mit 5 µg/ml Poly(I:C) behandelt (Kap. 3.1.5). Anschließend wurden von diesen Proben Microarrays durchgeführt und anhand der Daten Genexpressionsprofile erstellt (Kap. 3.3.5). Parallel wurden ALI-Zellkulturen der gleichen Spender für 28 Tage ohne Behandlung kultiviert und deren RNA als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Expressionsintensitäten von Poly(I:C)-behandelten ALI-Epithelien und unstimulierten Proben miteinander verglichen, der *Fold Change* berechnet und die daraus ermittelten Genexpressionsmuster ausgewertet (Kap. 3.3.5).

Es wurden zunächst die 100 am stärksten regulierten Gene genauer analysiert. Die Auswertung der *Heat Map* für die NHBEs ergab, dass von diesen 100 Genen 97 Gene durch

die Stimulation mit Poly(I:C) eine induzierte Expression zeigten und 3 Gene herunter reguliert wurden. Das Cluster dieser 100 Gene ergab eine klare Auftrennung der unbehandelten und Poly(I:C)-behandelten Proben. In der Poly(I:C)-Gruppe gab es spenderabhängige Unterschiede. Während die Spender A und D eine stärkere Induktion von fast allen 97 Genen aufwiesen, war diese Induktion bei Spender C am geringsten (Anhang Abb. A.4). Auch für die Expressionsprofile der 100 am stärksten regulierten Kandidaten der DHBECS ergab sich ein Clustering entsprechend der Behandlungsgruppen. Von diesen 100 Genen wurde dabei durch Gabe von Poly(I:C) die Expression von 99 Genen signifikant gesteigert, während nur ein Gen signifikant herunterreguliert wurde. Bei den DHBECS wich Spender I mit einer geringeren Genexpressionsintensität in der Poly(I:C)-Gruppe und Spender K mit einer höheren Expression von den anderen Spendern ab (Anhang Abb. A.5).

Für eine detailliertere Analyse der Wirkung von Poly(I:C) auf ALI-Epithelien von NHBECS und DHBECS wurden im Folgenden die 25 Gene mit dem höchsten *Fold Change* untersucht. Sowohl bei den NHBECS als auch DHBECS waren unter diesen Genen nur Gene, die eine starke Induktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigten. Zusätzlich waren die Expressionsprofile dieser Gene beim Vergleich zwischen NHBECS und DHBECS sehr ähnlich. Einundzwanzig Gene waren bei sowohl NHBECS als auch DHBECS in der Auflistung vertreten und lediglich jeweils vier Gene waren aufgrund eines geringeren *Fold Changes* jeweils nicht unter den 25 Genen aufgeführt (Tab. 4.4). In beiden Datensätze war *CXCL10* mit einem *Fold Change* von 88 für die NHBECS und 105 für die DHBECS das Gen mit der stärksten Induktion nach Poly(I:C)-Gabe im Vergleich zu den jeweiligen unstimulierten Kontrollen (Tab. 4.4 A & B). Die weiteren am stärksten exprimierten Gene bei den NHBECS waren *CCL20* und *OASL* (Tab. 4.4 A). Beide Gene waren auch bei den DHBECS unter den fünf am stärksten regulierten Genen vertreten (Tab. 4.4 B). Die zweit- und drittplatzierten Gene der DHBECS *IFIT2* (*Fold Change* 22) und *CXCL11* (*Fold Change* 18) wiesen in den NHBECS einen *Fold Change* von 12 für *IFIT2* und 7,1 für *CXCL11* auf. Weitere Gene, die innerhalb der Auflistung der NHBECS einen höheren Platz als in der Liste der DHBECS zeigten, waren *CXCL8*, *BCL2A1*, *IL-6*, *IFN-L1*, *PMAIP*, *TNFSF15*, *BIRC3*, *IL-1B* und *TNFAIP2*, wobei der *Fold Change* dabei nicht immer in den NHBECS höher als in den DHBECS war. Die Gene *IL-1A*, *CXCL11*, *IFIT3*, *IFN-L2* und *CCL5* wurden in den DHBECS stärker exprimiert als in den NHBECS (Tab. 4.4). *CXCL3* (Platz 16, *Fold Change* 5,6), *IRAK2* (Platz 22, *Fold Change* 5,0), *TRIM31* (Platz 24, *Fold Change* 4,6) und *PLAUR* (Platz 25, *Fold Change* 4,3) waren nur für die NHBECS unter den 25 Genen aufgelistet (Tab. 4.4 A). Die berechneten *Fold Changes* für diese Gene zeigten in den DHBECS vergleichbare Werte: *CXCL3*

belegte mit einem *Fold Change* von 3,3 Platz 46 in den Top 100 Genen der DHBECS. *IRAK2* wies einen *Fold Change* von 4,1 (Platz 31) auf, *TRIM31* 4,7 (Platz 27) und *PLAUR* 4,2 (Platz 30). Die Gene *IFIT1*, *CXCL9*, *RSAD2* und *CSF1*, welche nur unter den 25 am stärksten exprimierten

Tab. 4.4: Die 25 Gene mit den höchsten *Fold Changes* in Poly(I:C)-behandelten ALI-Zellkulturen von NHBECS und DHBECS. ALI-Zellkulturen von NHBECS (A) und DHBECS (B) wurden für 28 Tage unter ALI-Bedingungen kultiviert und an Tag 28 wurden 5 µg/ml Poly(I:C) für 3 h appliziert. Anschließend wurden Microarrays (ATLAS Biolabs, Berlin DE) dieser Proben durchgeführt und aus den Expressionsintensitäten die jeweiligen *Fold Changes* mit den unstimulierten entsprechenden Proben als Kontrolle berechnet. n = jeweils 5, *Fold Change Cut off* 2, p-Wert < 0,05.

A) NHBECS				B) DHBECS			
	Genname	<i>Fold Change</i>	p-Value		Genname	<i>Fold Change</i>	p-Value
1)	CXCL10	87,96	1,12e-03	1)	CXCL10	104,97	1,05e-06
2)	CCL20	18,72	3,62e-05	2)	IFIT2	22,40	1,46e-06
3)	OASL	15,59	1,23e-03	3)	CXCL11	17,92	1,43e-03
4)	CXCL8	12,31	3,52e-06	4)	CCL20	16,90	8,22e-05
5)	IFIT2	11,63	4,25e-03	5)	OASL	11,49	1,35e-04
6)	PTGS2	11,37	4,25e-03	6)	PTGS2	9,77	2,74e-04
7)	CD83	9,96	1,62e-03	7)	CCL5	9,51	2,05e-03
8)	BCL2A1	9,32	3,73e-04	8)	IL-1A	9,36	8,75e-04
9)	IL1-A	7,84	3,19e-03	9)	IFIT3	9,01	2,75e-05
10)	IL-6	7,34	5,67e-03	10)	CD83	8,85	4,18e-04
11)	CXCL11	7,07	1,46e-02	11)	CXCL8	8,43	1,78e-04
12)	IFIT3	6,57	4,10e-03	12)	IFIT1	8,26	1,33e-03
13)	IFN-L1	6,10	1,70e-02	13)	IL-6	8,19	1,64e-02
14)	PMAIP	6,04	2,93e-04	14)	BCL2A1	7,98	1,13e-03
15)	TNFSF15	5,92	8,34e-04	15)	CXCL9	7,76	2,13e-02
16)	CXCL3	5,55	7,94e-05	16)	IFN-L1	7,74	5,81e-03
17)	BIRC3	5,54	5,95e-05	17)	IFN-L2	7,58	2,23e-03
18)	IL-1B	5,48	2,29e-04	18)	TNFSF15	6,91	4,07e-04
19)	IFN-L2	5,46	3,03e-02	19)	RSAD2	5,95	1,05e-02
20)	CCL5	5,17	2,06e-02	20)	CSF1	5,84	1,21e-02
21)	TNFAIP2	5,03	6,77e-05	21)	IL-1B	5,77	9,91e-03
22)	IRAK2	4,97	1,74e-05	22)	BIRC3	5,67	4,20e-05
23)	TNFAIP3	4,70	7,06e-05	23)	TNFAIP3	5,42	1,89e-06
24)	TRIM31	4,60	3,95e-04	24)	PMAIP	5,37	1,31e-03
25)	PLAUR	4,32	7,15e-03	25)	TNFAIP2	5,12	5,36e-04

Genen der ALI-Zellkulturen der DHBECS aufgelistet waren (Abb. 4.4 B), zeigten geringere *Fold Changes* in den Proben der NHBECS. Der berechnete *Fold Change* in den NHBECS betrug für *IFIT1* 3,7 (Platz 35), für *CXCL9* 3,3 (Platz 47), *RSAD2* 3,4 (Platz 40) und *CSF1* 4,2 (Platz 27).

4.2.3 Das *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation zeigt ein kombiniertes Expressionsprofil aus rhIL-13- beziehungsweise Poly(I:C)-induzierten Genen

Da ein Ziel dieser Arbeit die Identifikation und Charakterisierung von potentiellen Biomarkern für die frühzeitige Erkennung einer Asthma-Exazerbation war, wurden zunächst Veränderungen des Transkriptoms in ALI-Zellkulturen des Asthma-Exazerbationsmodells mit den Genexpressionsmustern von unstimulierten Proben verglichen. Dazu wurden ALI-Epithelien von NHBECS und DHBECS von Tag 21 bis Tag 28 mit 5 ng/ml rhIL-13 behandelt und anschließend 5 µg/ml Poly(I:C) für 3 h zusätzlich appliziert (Kap. 3.1.5). Aus der gewonnenen RNA wurden danach Genexpressionsprofile mithilfe der Arraytechnologie erstellt und ausgewertet (Kap. 3.3.5).

Die Darstellung der normierten Expressionswerte der 100 am stärksten regulierten Gene zeigte eine deutliche Auftrennung entsprechend der unstimulierten und kostimulierten Proben. Die Proben der ALI-Zellkulturen der NHBECS, welche mit rhIL-13 und Poly(I:C) stimuliert wurden, wiesen für 95 Gene eine Induktion und für fünf Gene eine verminderte Expression im Vergleich zu den unstimulierten Proben auf (Anhang Abb. A.6). Bei der Auswertung der Expressionswerte für das *in vitro* Modell einer Exazerbation in ALI-Zellkulturen von DHBECS ergaben sich 99 Gene, welche eine verstärkte Expression nach den Behandlungen aufwiesen, und nur ein Gen wurde in geringerer Stärke als in den unbehandelten Kontrollen exprimiert (Anhang Abb. A.7).

Von diesen 100 Genen wurden die 25 höchsten *Fold Changes* für Gene, welche in der Exazerbation induziert waren, gemessen. Von diesen Genen waren 19 Gene sowohl in den Vergleichen der NHBECS als auch DHBECS identisch. Bei der nachgestellten Exazerbation wurden bei NHBECS und DHBECS *CST1* und *CXCL10* mit *Fold Changes* größer als 200 am stärksten induziert. Die weiteren identischen Gene, welche im *in vitro* Modell einer Exazerbation sowohl bei NHBECS als auch DHBECS induziert wurden, waren *CLCA1*, *SH2D1B*, *CXCL11*, *FETUB*, *CST4* und *OASL*. Gene, die in den NHBECS und DHBECS im Modell der Asthma-Exazerbation signifikant verstärkt exprimiert wurden, waren *IFIT2*, *CD83*, *DDP4*, *POSTN*,

IFN-L2, *IL-6*, *NOS2*, *IFN-L1*, *SLC26A4*, *CCL5* und *CD274* (Tab. 4.5). Jeweils sechs der 25 am stärksten regulierten Gene waren im Vergleich der *Fold Changes* der NHBEs und DHBEs unterschiedlich. *CCL26* (*Fold Change* 43), *PRB1* (*Fold Change* 41), *FAM177B* (*Fold Change* 27), *PRB2* (*Fold Change* 26) und *CYTIP* (*Fold Change* 22) gehörten bei den NHBEs zu den 25 am

Tab. 4.5: Die 25 Gene mit den höchsten *Fold Changes* in rhIL-13- und Poly(I:C)-kostimulierten ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBEs. ALI-Zellkulturen von NHBEs (A) und DHBEs (B) wurden von Tag 21 bis Tag 28 mit 5 ng/ml rhIL-13 stimuliert. Zusätzlich wurden an Tag 28 5 µg/ml Poly(I:C) für 3 h appliziert. Anschließend wurden Microarrays (ATLAS Biolabs, Berlin, DE) dieser Proben durchgeführt und aus den Expressionsintensitäten die jeweiligen *Fold Changes* mit den unstimulierten entsprechenden Proben als Kontrolle berechnet. n = jeweils 5, *Fold Change Cut off* 2, p-Wert < 0,05.

A) NHBEs				B) DHBEs			
	Genname	<i>Fold Change</i>	p-Value		Genname	<i>Fold Change</i>	p-Value
1)	CST1	618,70	1,21e-08	1)	CST1	332,93	4,98e-06
2)	CXCL10	299,54	1,11e-06	2)	CXCL10	202,50	6,17e-07
3)	CLCA1	201,65	2,40e-07	3)	CXCL11	68,74	8,14e-07
4)	SH2D1B	84,23	1,05e-06	4)	CLCA1	58,57	2,14e-03
5)	FETUB	65,39	1,59e-04	5)	FETUB	48,61	2,57e-04
6)	CST4	64,75	9,90e-09	6)	CST4	46,56	1,06e-05
7)	OASL	43,46	5,02e-08	7)	IFIT2	44,45	3,06e-10
8)	CCL26	42,59	1,55e-06	8)	SH2D1B	31,08	2,92e-05
9)	CXCL11	41,33	2,89e-04	9)	IFNL2	28,12	1,49e-06
10)	PRB1	40,75	1,28e-05	10)	IL-6	27,79	2,06e-03
11)	IFIT2	35,56	4,33e-06	11)	CCL5	26,71	7,09e-07
12)	ITLN1	32,24	8,10e-03	12)	POSTN	25,63	4,39e-05
13)	CD83	32,20	5,47e-08	13)	IFN-L1	25,22	8,84e-06
14)	DPP4	31,63	3,89e-06	14)	CD83	23,76	4,18e-08
15)	POSTN	29,34	3,01e-07	15)	OASL	23,42	8,40e-10
16)	FAM177B	27,27	3,11e-06	16)	CD274	22,85	3,46e-06
17)	IFN-L2	26,71	3,49e-04	17)	IFIT1	22,74	3,46e-07
18)	PRB2	25,55	6,68e-05	18)	CXCL9	20,47	1,64e-03
19)	IL-6	25,42	3,36e-05	19)	NOS2	20,16	1,44e-05
20)	NOS2	25,33	5,12e-08	20)	IL-1A	19,63	7,19e-05
21)	IFN-L1	23,35	1,12e-04	21)	DPP4	19,55	1,14e-04
22)	SLC26A4	22,26	7,32e-04	22)	CCL20	17,21	7,43e-05
23)	CYTIP	22,17	1,37e-05	23)	IFIT3	17,12	2,60e-10
24)	CCL5	22,08	2,45e-04	24)	SLC26A4	17,10	2,49e-05
25)	CD274	21,29	4,03e-07	25)	PLAUR	16,68	3,51e-07

stärksten exprimierten Genen nach der Kostimulation, während diese Gene lediglich unter den 100 am stärksten regulierten Genen in den DHBECS zu finden waren (Tab. 4.5 A, Anhang Abb. A.7). Dementsprechend ergaben sich geringere Werte für den jeweiligen *Fold Change* in den DHBECS (*CCL26*: Platz 44, *Fold Change* 9,8; *PRB1*: Platz 38, *Fold Change* 11; *FAM177B*: Platz 34, *Fold Change* 12; *PRB2*: Platz 51, *Fold Change* 8,5; *CYTIP*: Platz 60, *Fold Change* 6,8). Während im *in vitro* Modell der Asthma-Exazerbation der NHBECS *ITLN1* mit einem *Fold Change* von 32 erhöht exprimiert wurde, betrug der *Fold Change* in den Vergleichen der DHBECS 9,8 (Tab. 4.5 A). Dieser Wert war mit einem p-Wert von 0,07 allerdings nicht signifikant. Im Gegensatz zu den NHBECS wurde für *IFIT1* (*Fold Change* 23), *CXCL9* (*Fold Change* 20), *IL-1A* (*Fold Change* 20), *CCL20* (*Fold Change* 17), *IFIT3* (*Fold Change* 17) und *PLAUR* (*Fold Change* 17) ein höherer *Fold Change* in den DHBECS als den NHBECS ermittelt (Tab. 4.5). Für *IFIT3* betrug der *Fold Change* für die nachgestellte Exazerbation in ALI-Epithelien von NHBECS 16 (Platz 31), für *CXCL9* 11 (Platz 45), für *IL-1A* 16 (Platz 32), für *CCL20* 15 (Platz 34), für *IFIT3* 18 (Platz 28) und für *PLAUR* 17 (Platz 30).

Anschließend wurden die insgesamt 31 am stärksten regulierten Gene des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation in ALI-Epithelien von NHBECS sowie DHBECS mit den Tabellen der 25 am stärksten regulierten Genen der rhIL-13- beziehungsweise Poly(I:C)-Stimulation verglichen (Tab. 4.3, Tab. 4.4, Tab. 4.5). Bis auf das Gen *CD274* waren alle anderen Gene unter den Top 25 Genen der rhIL-13- beziehungsweise Poly(I:C)-Behandlung aufgeführt. Es wurden 50 % der 25 am stärksten regulierten Gene des Modells der Asthma-Exazerbation bereits durch die Stimulation mit rhIL-13 alleine signifikant induziert. Die Gene, die sowohl durch rhIL-13-Stimulation alleine als auch in dem *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation induziert wurden, waren *CCL26*, *CLCA1*, *CST1*, *CST4*, *DPP4*, *FAM177B*, *FETUB*, *ITLN1*, *NOS2*, *POSTN*, *PRB1*, *PRB2*, *SH2D1B* und *SLC26A4* (Tab. 4.3, Tab. 4.5). Dahingegen wurden *CCL5*, *CCL20*, *CD83*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *IFN-L1*, *IFN-L2*, *IL-1A*, *IL-6*, *OASL* und *PLAUR* sowohl durch Poly(I:C) alleine als auch im *in vitro* Modell der Asthma-Exazerbation induziert (Tab. 4.4, Tab. 4.5).

4.3 Identifizierung von potentiellen Biomarkern einer Asthma-Exazerbation

Nachdem ein ALI-Zellkulturmodell zur Nachstellung einer Asthma-Exazerbation erstellt und die verwendeten NHBEs und DHBEs hinsichtlich potentieller Unterschiede des Transkriptoms als Reaktion auf verschiedene Stimuli charakterisiert wurden, wurden die Datensätze der Microarrays für die Identifizierung von potentiellen Biomarkern des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation ausgewertet.

Hierzu wurden die Datensätze der Microarrays aller gemessener Proben aller Behandlungen untereinander verglichen. Die normierten Expressionsintensitäten der fünf Spender der jeweiligen Behandlungsgruppe (unstimuliert, rhIL-13, Poly(I:C), Kostimulation/Exazerbation) wurden gemittelt und die *Fold Changes* zwischen jeweils zwei Gruppen berechnet. Anschließend wurden die Vergleiche hinsichtlich eines spezifischen Kriteriums für die *Fold Changes* sortiert: eine signifikante Induktion in der nachgestellten Asthma-Exazerbation gegenüber der Stimulation mit rhIL-13 beziehungsweise Poly(I:C). Dies bedeutete einen *Fold Change* größer als der Wert 2 beziehungsweise kleiner als -2 für den Vergleich der Exazerbationsgruppe mit einer der anderen Behandlungen. Durch diese Voraussetzung wurden nur die Gene weiter ausgewertet, die eine Verstärkung der Genexpression bei einer Kostimulation gegenüber der Einzelbehandlung mit rhIL-13 beziehungsweise Poly(I:C) zeigten. Dadurch sollte die akute Verschlimmerung der Pathologie der Asthma-Erkrankung während einer Exazerbation nachgestellt werden.

Die Auswertung der Genexpressionsmuster für die Datensätze der NHBEs ergab, dass insgesamt 52 Gene im Modell der Asthma-Exazerbation gegenüber unstimulierten ALI-Epithelien, rhIL-13- sowie Poly(I:C)-behandelten Proben eine verstärkte Expression aufwiesen. Es wurden keine Gene gefunden, welche in der Exazerbation eine signifikant geringere Genexpression zeigten (Tab. 4.6).

Von diesen insgesamt 52 Genen wurde bei 27 Genen die Induktion der Expression durch die inflammatorische Antwort auf Poly(I:C) alleine ausgelöst. Diese Gene wiesen keinen signifikanten *Fold Change* im Vergleich von rhIL-13-behandelten Proben zu unstimulierten ALI-Zellkulturen auf, wohingegen durch Poly(I:C) alleine eine Induktion dieser Gene gegenüber den unstimulierten Proben nachgewiesen wurde. Zusätzlich war der *Fold Change* im Vergleich

der Exazerbationsgruppe zur unstimulierten Kontrolle signifikant erhöht. Da ein potentieller Biomarker eine weitere Verschlimmerung der Pathologie, sprich eine weitere Induktion der Genexpression gegenüber der Poly(I:C)-Stimulus aufweisen sollte, wurde zusätzlich der Vergleich der Exazerbationsgruppe zu den Expressionsintensitäten der Poly(I:C)-behandelten Proben untersucht. Alle 27 aufgelisteten Genen in Tabelle 4.6 A zeigten eine weitere Erhöhung der Genexpression durch die Kombination von rhIL-13- und Poly(I:C)-Applikation im Vergleich zu Poly(I:C) beziehungsweise rhIL-13 alleine. *CXCL10* wurde durch die Behandlung mit Poly(I:C) alleine am stärksten von den aufgeführten Genen induziert. Durch die zusätzliche Stimulation mit rhIL-13, sprich im Modell der Asthma-Exazerbation, wurde diese Induktion noch einmal um das 3,3-fache weiter verstärkt, auch wenn der p-Wert für diesen *Fold Change* nicht signifikant war (Tab. 4.6 A gesamt & rechts). Weitere Gene, die durch die Gabe von Poly(I:C) sehr stark induziert wurden, waren *CXCL11*, *CD83*, *IL-6*, *IFIT2*, *OASL*, *CCL5*, *IFN-L1* und *IFN-L2*, welche bei einer kombinierten Stimulation mit rhIL-13 und Poly(I:C) weitere Anstiege der Genexpression gegenüber der Poly(I:C)-Behandlung aufwiesen (Tab. 4.6 A gesamt & rechts). *ISG15*, *RSAD2*, *HERC5*, *CXCL9*, *TNIP3*, *TNF*, *EDN1*, *IFN-B1*, *IFIT1*, *IFIT3*, *C2CD4A*, *PMAIP1* und *IFN-L3* bildeten mit *Fold Changes* zwischen 7,3 und 17 für den Vergleich der Expressionswerte der Exazerbation mit unstimulierten Proben die Gruppe der mittelstark induzierten Gene. Die *Fold Changes* für den Vergleich zwischen Exazerbation und Poly(I:C)-Stimulation lagen zwischen 2,6 und 4,8. Die Gabe von Poly(I:C) in Kombination mit rhIL-13 dagegen führte zu der geringsten Geninduktion für *VCAM1*, *PTGER4*, *TMEM17*, *PRDM1* und *C8orf4*. Beim Vergleich der Expressionswerte der Exazerbationsgruppe und der Poly(I:C)-Gruppe waren die *Fold Changes* jedoch auch für diese Gene signifikant, wenn auch nicht so hoch wie für die anderen aufgeführten Gene (2,0 bis 2,5) (Tab. 4.6 A).

SH2D1B, *CD274*, *IDO1*, *DDX58* und *PLAUR* wurden sowohl durch die Behandlung mit rhIL-13 als auch Poly(I:C) alleine signifikant induziert. Dabei war die erhöhte Genexpression bei *SH2D1B* und *CD274* eher rhIL-13 abhängig und *IDO1*, *DDX58* und *PLAUR* zeigten nach Stimulation mit Poly(I:C) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle einen höheren *Fold Change*, sprich eine hochregulierte Genexpression. Durch die Kombination der Behandlung mit rhIL-13 zusammen mit Poly(I:C) konnte für diese fünf Gene eine weitere Erhöhung der Genexpression beobachtet werden, welche sowohl der Behandlung mit rhIL-13 beziehungsweise Poly(I:C) alleine gegenüber signifikant war (Tab. 4.6 B).

Gene, die eine signifikante Regulation durch die Behandlung mit rhIL-13 alleine gegenüber der unstimulierten Kontrolle zeigten und bei denen dieser Effekt durch die Kombination aus rhIL-13 und Poly(I:C) weiter verstärkt wurde, wurden nicht ermittelt.

Tab. 4.6: Fold Changes der unstimulierten, rhIL-13- und Poly(I:C)-behandelten ALI-Zellkulturen von NHBEs. Es wurden Microarrays von unstimulierten ALI-Zellkulturen von NHBEs, die 28 Tage unter ALI-Bedingungen kultiviert wurden, generiert. Ebenso wurden Expressionsprofile von ALI-Epithelien erstellt, die von Tag 21 bis Tag 28 mit 5 ng/ml rhIL-13 stimuliert wurden beziehungsweise denen an Tag 28 5 µg/ml Poly(I:C) appliziert wurde sowie von ALI-Zellkulturen, die mit rhIL-13 und Poly(I:C) behandelt wurden. Anschließend wurden die normierten Expressionsintensitäten gemittelt und die *Fold Changes* für die aufgeführten Gruppen berechnet. Es sind die Gene aufgelistet, welche einen signifikant erhöhten *Fold Change* in der Exazerbation gegenüber den anderen Behandlungen aufwiesen. Diese Gene wurden entsprechend des Stimulus sortiert, welcher die Asthma-Exazerbation im *in vitro* Modell auslöste: **A)** Poly(I:C)-induzierte Exazerbation, **B)** rhIL-13- und Poly(I:C)-induzierte Exazerbation, **C)** rhIL-13- und Poly(I:C)-unabhängige Exazerbation. *Fold Change* < -2 beziehungsweise *Fold Change* > 2, * p-Wert < 0,05, ** p-Wert < 0,01 und *** p-Wert < 0,001.

A) Gen	Fold Change rhIL-13 vs unstimuliert	Fold Change Poly(I:C) vs. unstimuliert	Fold Change Exazerbation vs. unstimuliert	Fold Change Exazerbation vs. rhIL-13	Fold Change Exazerbation vs. Poly(I:C)
<i>ISG15</i>	1,57 *	2,62 *	9,04 ***	5,60 **	3,32 *
<i>VCAM1</i>	1,49 **	2,08	3,81 **	2,62 *	2,30
<i>RSAD2</i>	1,28	3,42 *	10,90 **	7,66 **	2,97
<i>HERC5</i>	1,38 *	2,35	8,14 ***	6,73 ***	3,60 *
<i>CXCL9</i>	1,19	3,27 *	11,34 **	9,90 **	4,35
<i>CXCL10</i>	1,38	87,96 **	299,54 ***	251,18 ***	3,26
<i>CXCL11</i>	1,42	7,07 *	41,33 ***	38,88 ***	4,71 *
<i>TNIP3</i>	1,90 **	3,85 **	10,74 ***	5,62 ***	2,81 **
<i>PTGER4</i>	1,84 *	2,11 *	5,50 ***	2,89 ***	2,53 *
<i>TMEM171</i>	1,42 *	2,34 *	4,95 ***	3,42 ***	2,04 *
<i>EDN1</i>	1,77	2,36	7,32 **	3,69 *	2,91
<i>CD83</i>	-1,17	9,96 **	32,20 ***	36,54 ***	2,93 *
<i>TNF</i>	-1,11	3,08 **	7,96 ***	8,22 ***	2,79 *
<i>PRDM1</i>	1,84 ***	2,22 ***	5,64 ***	3,15 ***	2,48 ***
<i>IL-6</i>	1,25	7,34 **	25,42 ***	19,09 ***	3,55 *
<i>C8orf4</i>	1,49	2,38	6,44 **	3,90 **	2,43
<i>IFN-B1</i>	1,04	2,05	9,90 ***	10,89 ***	4,57 **
<i>IFIT2</i>	1,31 *	11,63 **	35,56 ***	30,79 ***	3,14
<i>IFIT3</i>	1,33	6,57 **	17,69 ***	12,13 ***	2,57 *
<i>IFIT1</i>	1,65	3,67 *	16,39 ***	9,82 ***	4,16 *
<i>OASL</i>	1,68 ***	15,59 **	43,46 ***	23,22 ***	2,59
<i>C2CD4A</i>	1,22	2,02 *	9,63 ***	7,23 ***	4,84 **
<i>CCL5</i>	1,18	5,16 *	22,08 ***	22,08 ***	4,06 *
<i>PMAIP1</i>	1,05	6,04 ***	13,45 ***	13,46 ***	2,21 *

<i>IFN-L2</i>	1,01	5,46 *	26,71 ***	33,97 ***	4,76 *
<i>IFN-L1</i>	-1,13	6,10 *	23,35 ***	23,43 ***	3,40
<i>IFN-L3</i>	-1,14	3,29 *	11,64 ***	14,15 ***	3,58 *

B) Gen	<i>Fold Change</i> rhIL-13 vs unstimuliert	<i>Fold Change</i> Poly(I:C) vs. unstimuliert	<i>Fold Change</i> Exazerbation vs. unstimuliert	<i>Fold Change</i> Exazerbation vs. rhIL-13	<i>Fold Change</i> Exazerbation vs. Poly(I:C)
<i>SH2D1B</i>	40,64 ***	2,57 **	84,23 ***	2,15 *	30,04 ***
<i>IDO1</i>	2,43	3,10 *	7,11 **	2,94 *	2,36
<i>CD274</i>	7,67 ***	3,03 *	21,29 ***	2,58 ***	7,01 ***
<i>DDX58</i>	2,33 ***	3,51 **	9,93 ***	4,45 ***	2,78 **
<i>PLAUR</i>	2,01 ***	4,31 **	16,52 ***	7,78 ***	3,67 **

C) Gen	<i>Fold Change</i> rhIL-13 vs unstimuliert	<i>Fold Change</i> Poly(I:C) vs. unstimuliert	<i>Fold Change</i> Exazerbation vs. unstimuliert	<i>Fold Change</i> Exazerbation vs. rhIL-13	<i>Fold Change</i> Exazerbation vs. Poly(I:C)
<i>MXD1</i>	1,30 *	1,95 **	4,32 ***	3,31 ***	2,15 **
<i>IFIH1</i>	1,68 ***	1,96 *	4,77 ***	2,96 ***	2,39 **
<i>CSRN1P1</i>	1,07	1,51 *	3,89 ***	3,25 ***	2,46 **
<i>FGF2</i>	1,25 *	1,60 *	5,94 ***	3,69 **	3,04 **
<i>NOCT</i>	1,27 **	1,88 **	4,40 ***	3,22 **	2,05 **
<i>IL-7R</i>	1,25	1,66 *	4,31 **	3,08 **	2,80 **
<i>LIFR</i>	1,52 *	1,76 *	4,68 ***	3,14 ***	2,67 **
<i>RAET1L</i>	1,67 **	1,28	3,31 ***	2,15 ***	2,67 ***
<i>FAM46A</i>	1,24	1,27	2,82 **	2,31 **	2,06 *
<i>HDAC9</i>	1,16	1,71 *	3,60 ***	2,53 ***	2,21 **
<i>WARS</i>	1,35 **	1,37 **	3,51 ***	2,55 ***	2,48 ***
<i>ADCY4</i>	1,69 ***	-1,03	4,04 ***	2,48 **	4,16 ***
<i>RIPK3</i>	1,18	1,18 *	3,03 ***	2,67 **	2,63 **
<i>SEMA7A</i>	1,74 **	1,39 *	5,33 ***	2,78 **	3,47 **
<i>CCL17</i>	1,46 **	1,03	3,17 ***	2,03 **	2,84 ***
<i>CCL2</i>	1,33 *	1,41	6,53 **	5,03 *	4,77 **
<i>LIPG</i>	1,97 **	1,94 **	4,23 **	2,02 *	2,27 *
<i>PPP1R15A</i>	-1,35 ***	1,89 *	3,98 **	5,64 ***	2,02 *
<i>TMPRSS2</i>	1,87 ***	1,42 **	4,40 ***	2,26 ***	2,98 ***
<i>APOBEC3A</i>	1,11	1,72	3,79 *	3,57 *	2,18

Es ergab sich noch eine weitere Gruppe an Genen, die während des *in vitro* Modells der Asthma-Exazerbation in NHBEs signifikant hochreguliert waren und somit als potentielle Biomarker interessant waren. Die Expression von insgesamt 20 Genen wurde weder durch die Behandlung mit rhIL-13 noch durch die mit Poly(I:C) alleine reguliert, sprich die Unterschiede

der *Fold Changes* waren bei den Vergleichen der Behandlung mit rhIL-13 beziehungsweise Poly(I:C) gegenüber den unstimulierten Proben nicht signifikant. Wurden die Expressionswerte der Exazerbationsgruppe jedoch mit den Datensätzen der unstimulierten Proben, der nur mit rhIL-13-behandelten Proben beziehungsweise der nur mit Poly(I:C)-stimulierten Proben verglichen, ergab sich bei diesen drei Vergleichen ein signifikanter *Fold Change*. Die bedeutete eine Induktion der Genexpression während der Exazerbation (Tab. 4.6 C). Die stärkste Induktion der Genexpression während der Exazerbation gegenüber der Kontrolle zeigten die Gene *FGF2* (*Fold Change* 5,9), *SEMA7A* (*Fold Change* 5,3) und *CCL2* (*Fold Change* 6,5). *MXD1*, *IFIH1*, *NOCT*, *IL-7R*, *LIFR*, *ADCY4*, *LIPG* und *TMPRSS2* zeigten eine positive Regulation bei diesem Vergleich (*Fold Changes* zwischen 4,0 und 4,8). Die Gene *CSRNP1*, *RAET1L*, *FAM46A*, *HDAC9*, *WARS*, *CCL17*, *PPP1R15A* und *APOBEC3A* wiesen einen *Fold Change* zwischen 2,8 und 4,0 für den Vergleich der Expressionsdaten des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation mit unbehandelten Proben auf (Tab. 4.6 C).

Im nächsten Schritt wurden diese 52 potentiellen Biomarker einer Asthma-Exazerbation im *in vitro* Modell mit NHBEs genauer untersucht. Es wurde ein funktionelles Netzwerk der Proteinprodukte dieser Gene erstellt, um genauere Informationen über die Mechanismen und Signalwege während der frühen Phase der Asthma-Exazerbation zu erhalten (Kap. 3.3.5, Abb. 4.13).

Bei der Betrachtung dieses funktionellen Netzwerkes wurden zwei Gruppen von Interaktomen deutlich. CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CCL5 bildeten einen Komplex aus zahlreichen Interaktionen untereinander. CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind Chemokine, die an den CXCR3-Chemokinrezeptor binden können, wohingegen CCL17 und CCL5 den CCR4-Chemokinrezeptor binden. Zusätzlich bildeten IFIH1, DDX58, ISG15, IFIT1-3, HERC5, RSAD2 und FGF2 ein Netzwerk aus Bindungen und daraus resultierenden Reaktionen. Diese Proteine können die Type I Interferon-Antwort mit regulieren. Im Netzwerk war dementsprechend auch ein Pfeil, der für die Aktivierung steht, zwischen DDX58 und IFN-B1 eingezeichnet. Zusätzlich ergab sich noch ein Netzwerk aus inhibitorischen Funktionen, Aktivierung und transkriptioneller Regulation um IL-6 herum. Dazu gehörten im engeren Kreis TNF, CCL5, IDO1, IL-7R, IFN-B1 und PRDM1, welche wiederum mit anderen Proteinen des Netzwerkes interagierten (Abb. 4.13).

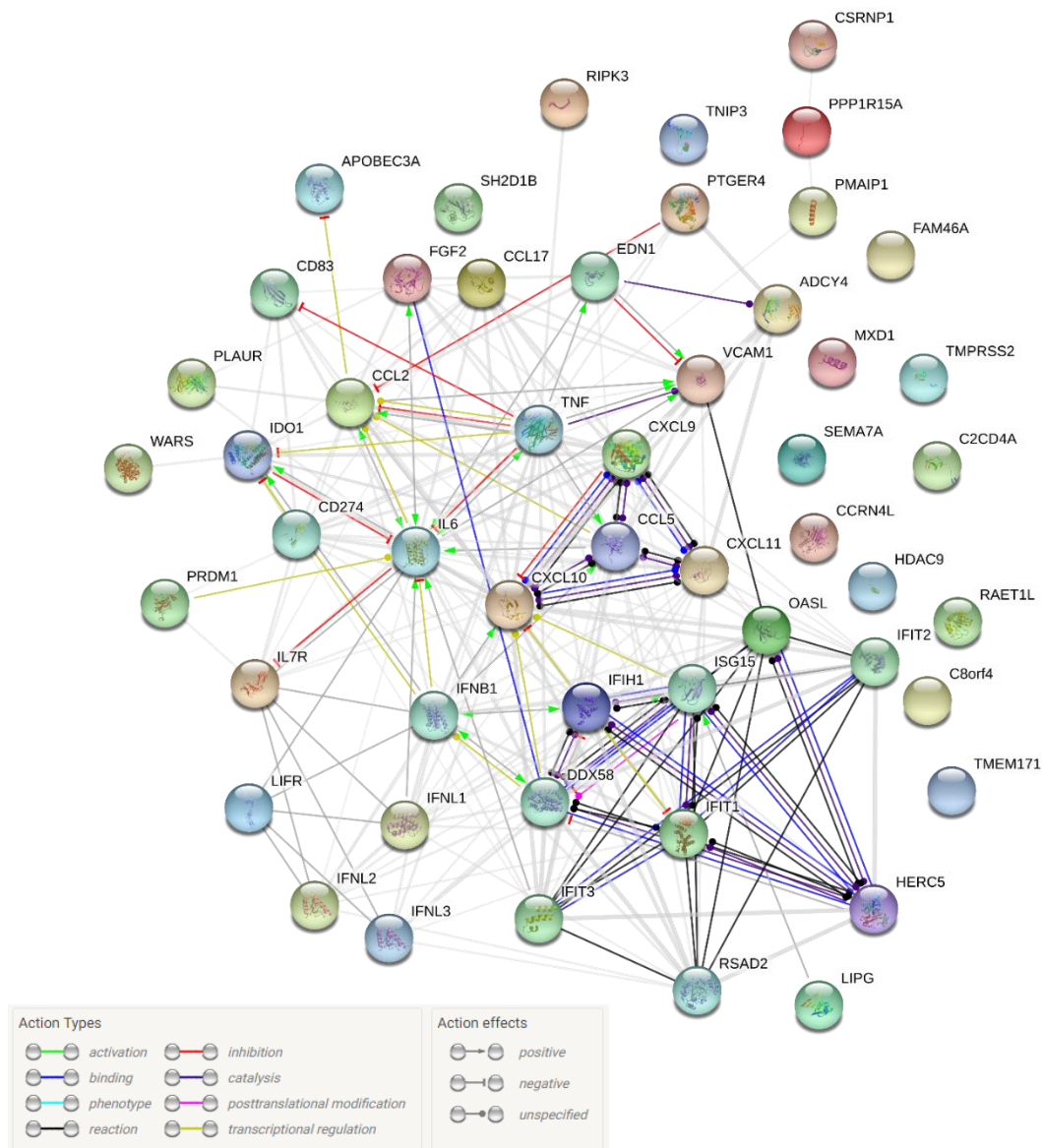


Abb. 4.13: Funktionelles Netzwerk der potentiellen Biomarker des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation mit NHBEs. Basierend auf den Ergebnissen aus Tabelle 4.6 wurde ein funktionelles Netzwerk der Proteine erstellt, deren mRNA in dem *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation von NHBEs signifikant erhöht war. Das Netzwerk wurde mit der Website <https://string-db.org/> erstellt. Graue Verbindungen zeigen alle Interaktionen basierend auf experimentellen Daten und veröffentlichten Manuskripten.

Da die bisherigen Untersuchungen Unterschiede in den Ergebnissen von ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBEs, welche mit dem gleichen experimentellen Protokoll behandelt wurden, nachgewiesen haben, wurden für die Identifizierung der potentiellen Biomarkern zusätzlich die Datensätze der verschiedenen Behandlungen der ALI-Epithelien von DHBEs untersucht. Entsprechend der Auswertung der Datensätze der NHBEs wurden auch für die DHBEs die verschiedenen Behandlungen mit den Proben des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation verglichen und der jeweilige *Fold Change* berechnet. Anschließend wurden diese Vergleiche hinsichtlich signifikanter *Fold Changes* im Vergleich zu den Proben der Exazerbation

ausgewertet. Diese Auswertungen ergaben, dass insgesamt 51 Gene eine signifikante Induktion im Exazerbationsmodell gegenüber den anderen Behandlungen zeigten (Tab. 4.7). Die meisten Gene waren dabei der Gruppe der durch Poly(I:C)-induzierten inflammatorischen Antwort zuzuordnen. Dies bedeutete, dass sich bereits beim Vergleich der Expressionsintensitäten der Poly(I:C)-Behandlung mit den unstimulierten Kontrollen ein signifikanter positiver *Fold Change* ergab, sprich eine Induktion der Genexpression durch Poly(I:C) alleine. Durch die Kombination aus rhIL-13 und Poly(I:C) in der Exazerbationsgruppe wurde die Expression dieser Gene weiter verstärkt, sodass signifikante *Fold Changes* für den Vergleich des Expressionsintensitäten der Exazerbationsgruppe mit denen der Poly(I:C)-Stimulation alleine ermittelt wurden. Insgesamt 31 Gene zeigten dieses Expressionsverhalten. Während bei den Vergleichen der Datensätze der NHBECS *CXCL10* eine sehr starke Induktion nach Poly(I:C)-Gabe und während der Exazerbation aufwies, tauchte dieses Gen in der Liste der potentiellen Biomarker der DHBECS nicht auf, da der *Fold Change* mit einem p-Wert von 0,06 nicht signifikant war (*Fold Change* 1,9). Die Auswertung der Datensätze der DHBECS zeigte die stärkste Induktion der Genexpression für *CXCL11* (*Fold Change* Exazerbation vs. unstimuliert 69) und *IFIT2* (*Fold Change* Exazerbation vs. unstimuliert 44). Diese Induktion während der Kostimulation war zusätzlich gegenüber der Poly(I:C)-Gruppe signifikant erhöht. Weitere Gene, die durch die Kostimulation mit rhIL-13 und Poly(I:C) stark induziert wurden, waren *CXCL9* (*Fold Change* 20), *CD83* (*Fold Change* 24), *IL-6* (*Fold Change* 28), *IFIT1* (*Fold Change* 23), *OASL* (*Fold Change* 23), *CCL5* (*Fold Change* 27), *IFN-L1* (*Fold Change* 25) und *IFN-L2* (*Fold Change* 28). Beim Vergleich der nachgestellten Exazerbation mit den Daten der Poly(I:C)-Applikation ergaben sich für diese Gene eine Induktion der Expression zwischen 2,0 und 3,4, wovon einige jedoch einen nicht signifikanten p-Wert aufwiesen. *IL-1A*, *RSAD2*, *HERC5*, *TNIP3*, *IFN-B1*, *DDX58*, *PMAIP1*, *IFN-L3*, *PLAUR* wiesen einen *Fold Change* zwischen 9,9 und 20 für den Vergleich zwischen der Exazerbation und den Kontrollen auf. Für *IFN-B1* wurde zusätzlich ein hochsignifikanter Anstieg der Genexpression in der Kostimulation gegenüber der Poly(I:C)-Behandlung alleine ermittelt. Die anderen Gene zeigten für diesen Vergleich auch eine weitere Erhöhung der Expression durch die Kostimulation (*Fold Changes* zwischen 2,0 und 3,4). Die weiteren zwölf Gene wiesen beim Vergleich der Daten der Kostimulation mit denen der unbehandelten Kontrolle einen *Fold Change* zwischen 3,8 und 8,4 sowie für den Vergleich zwischen Exazerbation und Poly(I:C)-Stimulation einen *Fold Change* von 2,0 bis 3,9 auf. Zu dieser Gruppen gehörten die Gene *ISG15*, *ATF3*, *IFIH1*, *CSRNP1*, *FGF2*, *PTGER4*, *LIFR*, *EDN1*, *TNF*, *PRDM1*, *C2CD4A* und *PPP1R15A* (Tab. 4.7 A)

Für die Gene *SH2D1B*, *CD274* und *CH25H* wurde beim Vergleich der Stimulation mit rhIL-13 beziehungsweise Poly(I:C) alleine mit den unstimulierten Kontrolle jeweils ein signifikanter positiver *Fold Change* ermittelt. Alle drei Gene zeigten dabei eine stärkere Induktion der Genexpression, sprich einen höheren *Fold Change*, bei der Stimulation mit rhIL-13 im Vergleich zu Poly(I:C) alleine. Der durch rhIL-13 beziehungsweise Poly(I:C) induzierte Anstieg der Genexpression, wurde durch die Kostimulation jeweils weiter verstärkt. Entsprechend der stärkeren Reaktion auf die Behandlung mit rhIL-13 betrugen die *Fold Changes* beim Vergleich der Exazerbation mit der rhIL-13-Stimulation Werte von 2,2 für *SH2D1B*, 2,4 für *CH25H* und 3,7 für *CD274* (Tab. 4.7 B).

Die dritte Gruppe bildeten 17 Gene, welche weder durch die Behandlung mit rhIL-13 noch mit Poly(I:C) alleine einen signifikanten Anstieg der Genexpression aufwiesen. Lediglich die Behandlung mit beiden Stimuli in Kombination führt zu einem signifikanten *Fold Change*. *JAK2* (*Fold Change* 4,7) und *RIPK3* (*Fold Change* 4,8) zeigten dabei die stärkste Induktion der Genexpression während der Exazerbation im Vergleich zu den Kontrollen. Die *Fold Changes* für diese Gene waren in den Vergleichen zwischen der Exazerbation und den einzelnen Stimuli signifikant. Weitere Gene mit einem hochsignifikanten *Fold Change* (4,0 bis 4,5) für den Vergleich der kostimulierten Proben mit denen der Kontrollen waren *MXD1*, *DDX60*, *TRIM15*, *C8orf4* und *TMEM106A*. Bei dem Vergleich der Expressionsintensitäten der Exazerbationsgruppe mit denen der rhIL-13-Stimulation lagen die *Fold Changes* zwischen 2,0 und 3,8, für den Vergleich mit Poly(I:C) zwischen 2,0 und 2,5. Weitere Gene mit signifikanten *Fold Changes* für alle Vergleiche zwischen der Exazerbationsgruppe und den jeweiligen Kontrollen beziehungsweise Behandlungen mit nur einem Stimulus waren *SLC26A9*, *RHOB*, *RAET1L*, *FAM64A*, *WARS*, *ADCY4*, *SEMA7A*, *CCL2* und *TMPRSS2*. Die Werte der *Fold Changes* für den Vergleich der Exazerbation mit den unbehandelten Kontrollen lagen zwischen 3,1 und 3,9. Nur *EPSTI1* zeigte für diesen Vergleich einen *Fold Change*, der kleiner als 3 war (2,8) (Tab. 4.7 C).

Für die weitere Auswertung und genauere Charakterisierung der insgesamt 51 potentiellen Kandidaten wurde ein funktionelles Netzwerk der Proteine, für die die Kandidaten codieren, erstellt (Kap. 3.3.5, Abb. 4.14). Das funktionelle Netzwerk zeigte viele Ähnlichkeiten zum Netzwerk der potentiellen Kandidaten der Daten-Analyse der NHBEs (Abb. 4.13). Insgesamt 42 Gene waren sowohl in der Auflistung der potentiellen Kandidaten basierend auf den Daten der NHBEs als auch der DHBEs vertreten (Tab. 4.6, Tab. 4.7). Bei beiden Datensätze waren

Tab. 4.7: Fold Changes der unstimulierten, rhIL-13- und Poly(I:C)-behandelten ALI-Zellkulturen von DHBECS. Es wurden Microarrays von unstimulierten ALI-Zellkulturen von DHBECS, die 28 Tage unter ALI-Bedingungen kultiviert wurden, generiert. Ebenso wurden Expressionsprofile von ALI-Epithelien erstellt, die von Tag 21 bis Tag 28 mit 5 ng/ml rhIL-13 stimuliert wurden beziehungsweise denen an Tag 28 5 µg/ml Poly(I:C) appliziert wurde sowie von ALI-Zellkulturen, die mit rhIL-13 und Poly(I:C) behandelt wurden. Anschließend wurden die normierten Expressionsintensitäten gemittelt und die *Fold Changes* für die aufgeführten Gruppen berechnet. Es sind die Gene aufgelistet, welche einen signifikant erhöhten *Fold Change* in der Exazerbation gegenüber den anderen Behandlungen aufwiesen. Diese Gene wurden entsprechend des Stimulus sortiert, welcher die Asthma-Exazerbation im *in vitro* Modell auslöste: **A)** Poly(I:C)-induzierte Exazerbation, **B)** rhIL-13- und Poly(I:C)-induzierte Exazerbation, **C)** rhIL-13- und Poly(I:C)-unabhängige Exazerbation. *Fold Change* < -2 beziehungsweise *Fold Change* > 2, * p-Wert < 0,05, ** p-Wert < 0,01 und *** p-Wert < 0,001.

A) Gen	<i>Fold Change</i> rhIL-13 vs unstimuliert	<i>Fold Change</i> Poly(I:C) vs. unstimuliert	<i>Fold Change</i> Exazerbation vs. unstimuliert	<i>Fold Change</i> Exazerbation vs. rhIL-13	<i>Fold Change</i> Exazerbation vs. Poly(I:C)
ISG15	1,17	2,55 *	7,35 ***	6,62 ***	2,79 *
ATF3	-1,22	2,29 *	5,02 ***	7,24 ***	2,02 *
IL-1A	1,56	9,36 ***	19,63 ***	11,96 ***	2,05
IFIH1	1,40 **	2,80 **	6,24 ***	4,61 ***	2,27 *
RSAD2	1,12	5,95 *	14,87 ***	15,82 ***	2,48
CSRNP1	1,26	2,13 *	3,86 ***	2,97 ***	2,09 *
HERC5	-1,05	4,03 *	14,00 ***	12,55 ***	3,36 *
FGF2	1,18	2,51	5,22 ***	4,62 **	2,38 *
CXCL9	1,03	7,76 *	20,47 **	20,72 **	2,49
CXCL11	1,16	17,92 **	68,74 ***	61,49 ***	3,17
TNIP3	1,60	4,66 **	11,93 ***	8,85 ***	2,42 *
PTGER4	1,64	2,84 **	6,90 ***	4,03 ***	2,23 ***
LIFR	1,71 **	2,31 **	6,46 ***	3,61 ***	2,66 **
EDN1	1,33	2,33	5,47 **	3,54 **	2,43
CD83	-1,02	8,85 ***	23,76 ***	27,01 ***	2,43 **
TNF	-1,03	2,41 **	5,39 **	6,09 ***	2,01
PRDM1	1,53	2,54 **	6,10 ***	3,93 ***	2,32 **
IL-6	1,06	8,19 *	27,79 **	24,88 **	3,07
IFN-B1	1,06	2,91 *	12,99 ***	13,22 ***	4,72 **
DDX58	1,99 ***	4,95 ***	13,19 ***	6,56 ***	2,54 **
IFIT2	1,32	22,40 ***	44,45 ***	33,24 ***	2,05 *
IFIT1	-1,00	8,26 **	22,74 ***	21,61 ***	2,57 *
OASL	1,10	11,49 ***	23,42 ***	21,70 ***	2,01 *
C2CD4A	1,05	2,12 *	8,37 ***	8,04 ***	3,90 ***
CCL5	-1,06	9,51 **	26,70 ***	30,71 ***	2,56
PMAIP1	1,01	5,37 **	11,07 ***	11,19 ***	2,12 *
IFN-L2	1,01	7,57 **	28,12 ***	26,26 ***	3,46 *
IFN-L1	-1,01	7,74 **	25,22 ***	21,32 ***	3,02 *
PPP1R15A	-1,19	2,17 **	5,07 ***	6,28 ***	2,27 **

<i>IFN-L3</i>	-1,01	3,27 *	10,88 ***	11,58 ***	3,47 *
<i>PLAUR</i>	1,71 *	4,21 **	16,68 ***	9,93 ***	3,97 **

B) Gen	Fold Change rhIL-13 vs unstimuliert	Fold Change Poly(I:C) vs. unstimuliert	Fold Change Exazerbation vs. unstimuliert	Fold Change Exazerbation vs. rhIL-13	Fold Change Exazerbation vs. Poly(I:C)
<i>SH2D1B</i>	14,00 ***	2,38 *	31,08 ***	2,22 ***	14,10 ***
<i>CD274</i>	6,12 ***	4,58 *	22,85 ***	3,70 ***	5,11 *
<i>CH25H</i>	3,98 **	2,76 *	9,61 ***	2,35 **	3,76 **

C) Gen	Fold Change rhIL-13 vs unstimuliert	Fold Change Poly(I:C) vs. unstimuliert	Fold Change Exazerbation vs. unstimuliert	Fold Change Exazerbation vs. rhIL-13	Fold Change Exazerbation vs. Poly(I:C)
<i>SLC26A9</i>	1,77	1,97 *	3,89 ***	2,39 *	2,07 *
<i>RHOB</i>	1,02	1,42	3,23 ***	3,18 ***	2,16 **
<i>MXD1</i>	1,19	1,95 *	4,49 ***	3,84 ***	2,34 **
<i>DDX60</i>	1,34	1,87 *	4,36 ***	3,23 ***	2,33 **
<i>TRIM15</i>	1,12	1,84	4,06 *	3,38 *	2,02
<i>RAET1L</i>	1,42	1,20	3,27 ***	2,23 **	2,94 ***
<i>FAM46A</i>	1,27	1,92 *	3,74 ***	3,19 ***	2,02 *
<i>C8orf4</i>	1,33	1,97	4,47 ***	3,19 **	2,48 *
<i>JAK2</i>	1,43	1,88 **	4,67 ***	3,08 ***	2,63 **
<i>EPSTI1</i>	1,05	1,41	2,77 ***	2,74 **	2,10
<i>WARS</i>	1,19	1,55 *	3,88 ***	3,41 ***	2,48 **
<i>ADCY4</i>	1,32	1,07	3,70 ***	3,42 ***	4,37 ***
<i>RIPK3</i>	1,28 *	1,35 *	4,84 ***	3,80 ***	3,62 ***
<i>SEMA7A</i>	1,20	1,27	3,18 ***	2,59 ***	2,69 ***
<i>CCL2</i>	1,17	1,62	3,84 ***	3,67 ***	2,65 *
<i>TMEM106A</i>	1,98 **	1,72 **	4,19 ***	2,01 **	2,39 ***
<i>TMPRSS2</i>	1,67 **	1,47 *	3,62 ***	2,18 ***	2,48 ***

zwei größere Interaktionsgruppen zu beobachten. Zum einen ergaben sich Interaktionen zwischen CCL5, CXCL9 und CXCL11 (bei den NHBECs zusätzlich CXCL10). Zum anderen bildete sich ein Netzwerk aus Interaktionen zwischen IFIH1, IFIT1-3, DDX58, HERC5, ISG15, RSAD2 und OASL (Abb. 4.13, Abb. 4.14). Weiterhin war auch im Netzwerk basierend auf den Daten der ALI-Epithelien der DHBECs IL6 ein wichtiges Protein im Mittelpunkt von verschiedenen Regulationsmechanismen. Neben den bereits für das Netzwerk der NHBECs beschriebenen Interaktionen, ergab sich im *in vitro* Modell mit DHBECs zusätzlich JAK2 als ein potentieller Kandidat für eine Asthma-Exazerbation. Zwischen IL-6 und JAK2 wurden inhibitorische

Interaktionen dargestellt. Zusätzlich interagiert JAK2 mit LIFR, EDN1, CD274 (Inhibition) und ADCY4. Weiterhin waren die beiden Gene *ATF3* und *CH25H* in den exazerbierten ALI-Zellkulturen der DHBECS signifikant induziert. In der Darstellung des funktionellen Netzwerkes ergab sich eine inhibitorische Rolle von ATF3 auf CCL2. Außerdem wirkte ATF3 negativ auf die transkriptionelle Regulation von CH25H, während es selber durch TNF aktiviert wird (Abb. 4.14).

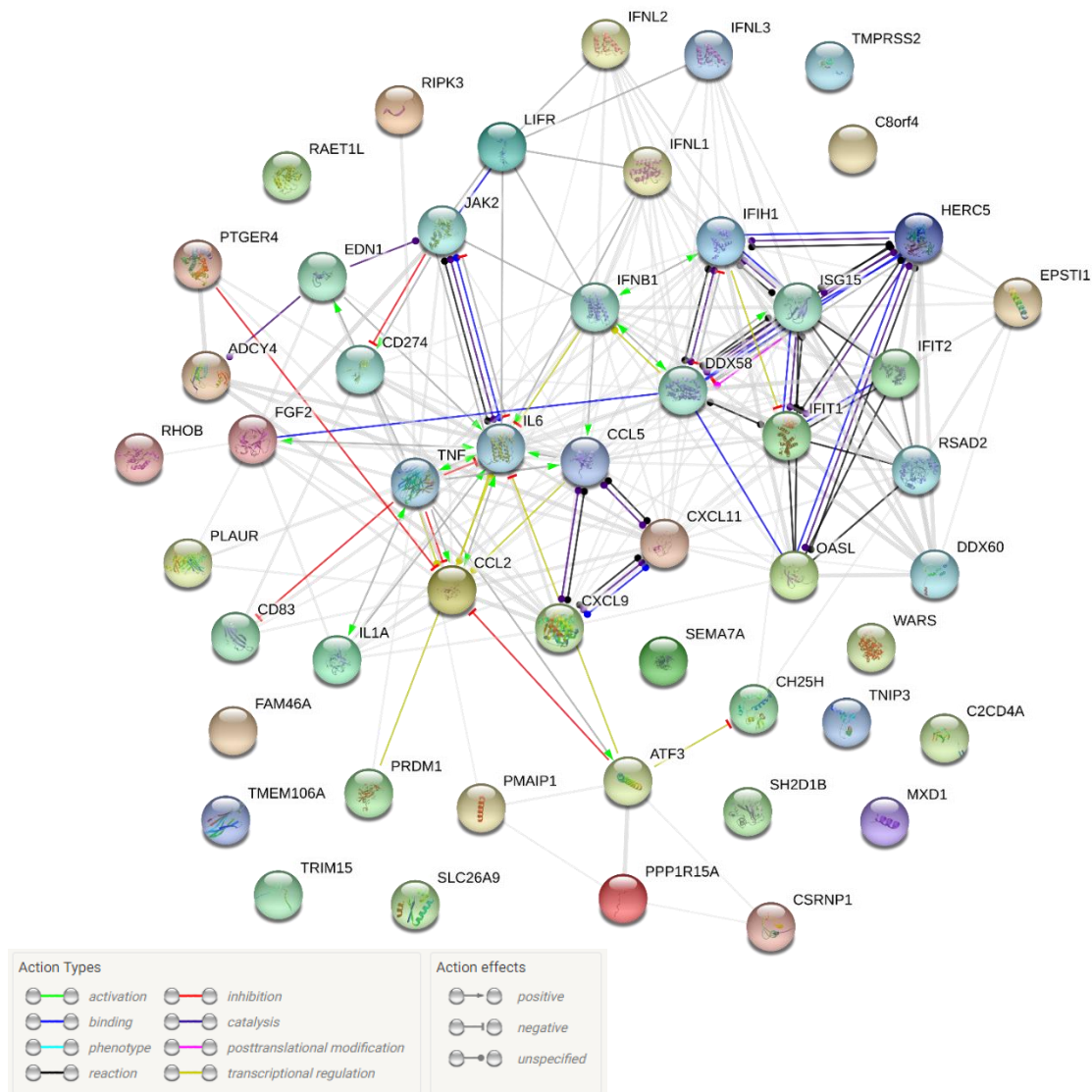


Abb. 4.14: Funktionelles Netzwerk der potentiellen Biomarker des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation mit DHBECS. Basierend auf den Ergebnissen aus Tabelle 4.7 wurde ein funktionelles Netzwerk der Proteine erstellt, dessen mRNA in dem *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation von DHBECS signifikant erhöht war. Das Netzwerk wurde mit der Website <https://string-db.org/> erstellt. Graue Verbindungen zeigen alle Interaktionen basierend auf experimentellen Daten und veröffentlichten Manuskripten.

5 Diskussion

Chronisches Asthma ist mit 339 Millionen Erkrankten weltweit eine der häufigsten Lungenerkrankungen (1). Bei adäquater Behandlung kann die Erkrankung weitestgehend auf einem stabilen Niveau gehalten werden, jedoch können verschiedene Trigger plötzlich auftretende akute Verschlimmerungen, sogenannte Asthma-Exazerbationen, auslösen. Asthma-Exazerbationen verursachen höhere Kosten für die Gesundheitssysteme als stabiles Asthma, da die Patienten aufgrund der Verschlimmerung des gesundheitlichen Zustandes eine erhöhte Medikation und teilweise sogar einen Krankenhausaufenthalt benötigen (110, 111, 166). Zusätzlich sind Exazerbationen mit einer langfristigen Verschlechterung der Lebensqualität, sich stetig verringernden Lungenfunktion sowie einem erhöhten Risiko für weitere Exazerbationen verbunden (111-115). Auch wenn durch die Gabe von Kortikosteroiden, lang-wirkenden β_2 -Agonisten und anderen Therapien das Risiko einer Exazerbation bei einigen Patienten gesenkt werden kann, gibt es immer noch viele Patienten, die ein bis mehrmals im Jahr eine Asthma-Exazerbation erleiden (114, 119). Bis heute gibt es keine etablierten prädiktiven Biomarker, die zur Einleitung einer frühen Therapie eingesetzt werden könnten, um dadurch die Anzahl an Exazerbation zu reduzieren. Asthma-Exazerbationen werden vor allem von Viren induziert, die das Atemwegsepithel infizieren. Das Bronchialepithel bildet das atemwegsauskleidende Gewebe und dient als Barriere sowie erste Hürde für virale Infektionen. Zusätzlich ist das Epithel der Ursprung vieler Mediatoren, die für die Entstehung der allergischen Entzündung bei Asthma und die Inflammation während der Exazerbation notwendig sind (132).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein 3D-Zellkulturmodell zur Nachstellung der epithelialen Antwort während der Initiierung einer Exazerbation etabliert und charakterisiert (Kap. 4.1). Heutzutage gibt es eine Vielzahl an möglichen epithelialen Zellkulturmodellen. So gibt es immortalisierte Zelllinien oder auch primäre Epithelzellen, welche unter submersen Bedingungen kultiviert werden können (167, 168). Da das Atemwegsepithel *in vivo* jedoch aus einem Zellverband mit verschiedenen Zelltypen besteht, wurde in dieser Arbeit das sogenannte *Air-liquid Interface*-Zellkulturmodell, das ein ausdifferenziertes Atemwegsepithel von primären humanen Bronchialepithelzellen lungen-gesunder und asthmatischer Spender ableitet, verwendet (Kap. 3.1). Dieses Modell bietet eine Möglichkeit, die Lücke zwischen den

bisher gewonnenen Erkenntnissen durch Mausmodellen zur *in vivo* Situation der Lunge zu schließen. Dies ist für die aktuelle Forschung wichtig, da Mausmodelle einige immunologische und physiologische Limitierungen im Vergleich zur humanen *in vivo* Situation aufweisen (168). So gibt es strukturelle Unterschiede in der Maus wie eine monopodiale Verästelung der Bronchien, keine respiratorischen Bronchiolen und eine andere Zusammensetzung des Atemwegepithels. In gesunden Mäusen sind im Gegensatz zum humanen Atemwegsepithel sekretorische Zellen kein substantieller Teil der Trachea und der Anteil an Basalzellen ist geringer (82). Weiterhin zeigten Vergleiche der Transkriptome von *in vivo* Bronchialepithelien humaner Biopsien mit Zellkulturen von primären HBECs, die unter ALI- oder submersen Bedingungen gewachsen sind, und ALI-Zellkulturen der immortalisierten Zelllinie Calu-3, dass die differenzierten ALI-Epithelien der HBECs die größte Ähnlichkeit bezüglich der Genexpression zu *in vivo* Atemwegsepithelien aufwiesen (169). In dem in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmodell wuchsen die primären Epithelzellen für 28 Tage auf einer semipermeablen Membran, sodass die Zellen über die basale Seite mit lebenswichtigen Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Mediatoren für die Differenzierung versorgt wurden, während die apikale Seite mit der Umgebungsluft im Kontakt stand (Kap. 3.1.4). Die morphologische Untersuchung und die Analyse der Genexpression verschiedener zelltypspezifischer Marker von ALI-Zellkulturen von sowohl NHBEs als auch von DHBECs ergab, dass sich während dieser vier Wochen ein pseudostratifizierter Zellverband aus basal gelegenen Basalzellen sowie zilientragenden und sekretorischen Zellen ausbildete (Abb. 4.1, Abb. 4.2). Damit entsprachen der Aufbau und die Zusammensetzung dieses Zellverbandes dem Aufbau des humanen Atemwegsepithels *in vivo* (76). Bis Tag 14 war nur für CK-5, einem Gen spezifisch für Basalzellen, eine signifikante Veränderung der Expression messbar und bis zu diesem Zeitpunkt waren die Basalzellen die einzigen immunhistochemisch nachweisbaren Zellen der in dieser Arbeit analysierten Zelltypen, die auch im weiteren zeitlichen Verlauf an der basalen Seite als Zellpopulation erhalten blieben (Abb. 4.1, Abb. 4.2). Somit bleibt auch der funktionelle Beitrag der Basalzellen als Stammzellen des Epithels und deren Beteiligung an Reparatur- und Regenerationsprozessen bestehen (170, 171). Die Zilien an der apikalen Seite des *in vitro* Epithels waren immunhistochemisch erst ab Tag 21 eindeutig nachweisbar, wohingegen die mukusproduzierenden Becherzellen bereits ab Tag 14 beobachtet werden konnten (Abb. 4.1), was sich mit vorherigen Studien deckte (172, 173). Während teilweise beschrieben wurde, dass das ALI-Epithel bereits nach circa zwei Wochen ausdifferenziert ist (174, 175), zeigten die Ergebnisse der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der

Differenzierung dieser Arbeit, dass erst nach 21 Tagen alle Zelltypen im *in vitro* Epithel nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.1). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Protokollen anderer Publikationen (153, 172, 176). Allerdings zeigte die weitere Kultivierung der NHBEs und DHBEs unter ALI-Bedingungen, dass eine Differenzierung bis Tag 28 für die vollständige Ausbildung eines funktionellen *in vitro* Epithels vorteilhaft ist (Abb. 4.1). Dementsprechend wurden die Zellen in dieser Arbeit für jeweils vier Wochen unter ALI-Bedingungen kultiviert, wie es auch von anderen Gruppen praktiziert wird (177-179). Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Differenzierung ist für ALI-Experimente von großer Bedeutung, da der Status der Differenzierung sich auf die epitheliale Antwort auswirkt. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass der Status der Differenzierung die Freisetzung von Eotaxin-2 und -3 nach Stimulation mit IL-4 und IL-13 unterschiedlich reguliert (180). Weiterhin beeinflusst der Grad der Differenzierung die Infektion mit Rhinoviren und Influenza-Viren dergestalt, dass vollständig differenzierte *in vitro* Epithelien eine geringere Infektionsrate und eine Immunantwort aufweisen, die sich von submersen Zellkulturen unterscheidet (176, 181).

Neben dem Aufbau des Epithels ist auch die prozentuale Verteilung der verschiedenen Zelltypen ein wichtiger Aspekt für die Vergleichbarkeit des ALI-Epithels mit dem Gewebe *in vivo*. In den Atemwegen der humanen Trachea nehmen die zilientragenden Zellen circa 80 % der Apikalseite ein, während die sekretorischen Zellen nur 15 bis 20 % der Zellen an der apikalen Seite ausmachen (182). Die quantitative Auswertung des Anteils an mukusproduzierenden Becherzellen an der apikalen Seite des ALI-Epithels betrug bei Zellkulturen von lungen-gesunden Spendern circa 50 % und einem daraus resultierend geringeren Anteil an zilientragenden Zellen als *in vivo* (Abb. 4.5 B unstimuliert & D unstimuliert). Diese Verschiebung in Richtung eines geringeren Anteils an zilientragenden Zellen scheint für ALI-Epithelien typisch zu sein (172, 173, 179). Die geringere Ziliendichte in ALI-Zellkulturen könnte durch eine geringere Expression von Genen, die für die Differenzierung zu zilientragenden Zellen und die Ausbildung der Zilien verantwortlich sind, verursacht oder Prozessen der De- und Re-Differenzierung der verwendeten HBECs geschuldet sein (169, 179, 183).

Zusammengefasst zeigt das 3D-ALI-Zellkulturmodell mit primären humanen Bronchialepithelzellen viele Aspekte des humanen *in vivo* Atemwegsepithels, sodass mit diesem Zellkulturmodell eine gute Ausgangslage geschaffen ist, um Ergebnisse zu generieren, die eine gute Übertragbarkeit auf die humane *in vivo* Situation und somit eine gute Grundlage für die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit bieten sollte.

Der zeitliche Ablauf der Differenzierung und der Aufbau des ALI-Epithels von DHBECS entsprach dem der ALI-Zellkulturen von NHBECS. Jedoch schien der Anteil an gespeichertem Mukus und daraus resultierend der Anteil an Becherzellen bei ALI-Zellkulturen von DHBECS ab Tag 21 im Vergleich zu denen von NHBECS leicht erhöht zu sein (Abb. 4.1, Abb. 4.3.). Die quantitative Auswertung des Anteils an Becherzellen und des Mukusvolumens ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede in der prozentualen Verteilung der Zelltypen zwischen NHBECS und DHBECS (Abb. 4.5 B unstimuliert & D unstimuliert). Somit konnte die für Asthma charakteristische Becherzellmetaplasie durch die Differenzierung alleine nicht generiert werden. Diese Beobachtung ist mit vorherigen Untersuchungen kongruent (184). Als Grund hierfür wird vermutet, dass während der Asthma-Erkrankung *in vivo* eine Vielzahl an Mediatoren von verschiedenen Zellen ausgeschüttet werden, welche auf das Epithel wirken (158). Diese sind während der Differenzierung nicht verfügbar. Zusätzlich durchlaufen die HBECs während der Isolierung und Aufarbeitung eine De-Differenzierung, wodurch die Zellkultur anfangs nur aus Basalzellen besteht, gefolgt von anschließender Re-Differenzierung (179). Dementsprechend war im nächsten Schritt dieser Arbeit die Generierung eines asthmatischen Phänotyps des Epithels für die spätere Untersuchung einer Asthma-Exazerbation in einem *in vitro* Modell notwendig.

Da allergisches eosinophiles Asthma eine Krankheit ist, bei der die Th₂-vermittelte Inflammation dominiert, spielen Th₂-Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 eine wichtige Rolle (158). So ist IL-13 an der Ausprägung charakteristischer Eigenschaften von Asthma wie der AHR, Hypersekretion von Mukus und der subepithelialen Fibrose beteiligt (185, 186). Zusätzlich ist es in die Regulierung der Produktion von IgE durch B-Lymphozyten, der Expression des IgE-Rezeptors FcεRII (CD23) auf verschiedenen inflammatorischen Zellen, wie den Makrophagen, und der Freisetzung von Eotaxinen durch das Atemwegsepithel involviert (187). Damit verbunden wurde in bronchialen Biopsien und Sputum von Patienten mit schwergradigem Asthma ein erhöhtes Level an IL-13 gefunden (188). Da bereits gezeigt werden konnte, dass IL-13 *in vitro* eine Becherzellmetaplasie in Zellkulturmodellen mit HBECs induzieren kann (189), wurde in dieser Arbeit rekombinantes humanes IL-13 eingesetzt, um einen Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyp zu etablieren. Der Verlauf der Differenzierung ergab, dass ab Tag 21 ausreichend Becherzellen vorhanden waren, sodass dieser Zeitpunkt für den Start der Stimulation mit rhIL-13 gewählt wurde (Abb. 3.3 A, Abb. 4.1). Histologische Färbungen von ALI-Epithelien von NHBECS sowie DHBECS wiesen nach der rhIL-13-Behandlung eine konzentrationsabhängige Becherzellmetaplasie auf (Abb. 4.5). Diese Ergebnisse sind mit

Beobachtungen von Atherton *et al.* übereinstimmend, welche bei einer eingesetzten Konzentration von 1 ng/ml IL-13 einen fünf- bis zehnfachen Anstieg der Anzahl an Becherzellen gemessen hatten (189). Zusätzlich zur Becherzellmetaplasie nahm die Expression von *MUC5AC* bei ALI-Zellkulturen von NHBEs sowie DBECs mit steigender rhIL-13-Konzentration signifikant zu (Abb. 4.4). Diese Veränderung der Genexpression spiegelt die Hyperproduktion des Mukus bei Asthmatikern wider. Denn der verstärkt produzierte und sezernierte Mukus enthält bei Asthma als Muzin vor allem *MUC5AC* (100, 190). Durch das Verschieben des Gleichgewichtes zwischen *MUC5B*, welches in Atemwegen von gesunden Individuen vorherrscht, in Richtung *MUC5AC*, kommt es zu einer verschlechterten Mukus-Clearance und geringeren Apoptose von Eosinophilen im Atemwegslumen (100, 106, 191). Die erhöhte *MUC5AC*-Expression wurde zusammen mit einem erhöhten Level an IL-13 vor allem in dem von Woodruff *et al.* definierten *Th₂-high*-Endotyp bei Asthma gefunden. Dieser Endotyp charakterisiert eine große Patientengruppe mit eosinophilem Asthma und ist durch eine Reihe weiterer Gene charakterisiert (192). So sind unter anderem noch die Expression des Calcium-aktivierten Chloridkanals *CLCA1*, des Serinepeptidase-Inhibitors *SerpinB2* und Periostin (*POSTN*) bei Asthma hochreguliert (159). Erhöhte Level an Periostin wurden bereits in den Atemwegen von Asthma-Patienten mit einer Eosinophilie nachgewiesen und gelten als Marker für die eosinophile Inflammation und das Atemwegs-*Remodeling* (193, 194). Allein durch die Gabe von rhIL-13 wurde die Genexpression von sowohl *CLCA1* als auch *SerpinB2* in Zellkulturen von NHBEs und DBECs dosisabhängig erhöht (Abb. 4.4). Dies wurde mit Genexpressionsprofilen von NHBEs und DBECs bestätigt, in denen *CLCA1* zu einem der am stärksten hochregulierten Genen bei den Vergleichen der Genexpressionsmuster der rhIL-13-stimulierten mit unstimulierten Zellkulturen gehörte (Kap. 4.2.1, Tab. 4.3). Weiterhin wurde auch Periostin unter den 25 Genen mit der stärksten Veränderung in der Expression aufgeführt (Tab. 4.3). Diese Wirkung von IL-13 in ALI-Epithelien deckt sich mit den Ergebnissen von Mertens *et al.* (195). Eine weitere wichtige Rolle des Atemwegsepithels ist die Freisetzung von chemotaktischen Lockstoffen für Eosinophile zu denen auch die Eotaxine CCL11, CCL24 und CCL26 gehören (196). Die Genexpressionslevel von *CCL24* und *CCL26* sind in epithelialen Bürstungen von asthmatischen Patienten erhöht und mit einer geringeren Lungenfunktion, erhöhten Anzahl an Eosinophilen im Sputum und öfter auftretenden Asthma-Exazerbationen verbunden (197). *In vitro* führt die Stimulation mit IL-13 zur Produktion von CCL-26 durch die Bronchialepithelzellen (198). Solch eine Erhöhung in der Genexpression von *CCL26* konnte in ALI-Epithelien von NHBEs und DBECs durch Stimulation mit rhIL-13 für 7 Tage induziert

werden (Abb. 4.4, Tab. 4.3). Die Auswertung der Genexpressionsprofile und Vergleiche der unstimulierten und rhIL-13-stimulierten ALI-Zellkulturen ergaben weitere asthma-assoziierte Gene, die durch rhIL-13 *in vitro* induziert wurden. So war zum Beispiel die Expression von *SCL26A4*, welches für das Protein Pendrin kodiert, sowohl in ALI-Epithelien der NHBEs als auch DHBECs durch die Applikation von rhIL-13 stark erhöht (Tab. 4.3). Pendrin ist ein integrales Membranprotein, das Anionen wie Chlorid und Thiocyanat transportiert (199). Es wurde in einem Tiermodell des experimentellen Asthmas verstärkt an der apikalen Membran von Bronchialepithelzellen exprimiert und ist an der Mukus-Überproduktion durch Beeinflussung der Genexpression und Proteinsynthese von MUC5AC beteiligt (200). Weiterhin wurde die Genexpression der Dipeptidylpeptidase-4 (*DPP-4*, *CD26*) in ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBECs durch die rhIL-13-Stimulation signifikant hochreguliert (Tab. 4.3). DPP4 wird erst seit Kurzem genauer im Zusammenhang mit Asthma untersucht, sodass die genauen Mechanismen noch nicht vollkommen verstanden sind. Es scheint jedoch direkt auf die Proliferation von glatten Bronchialmuskelzellen und Lungenfibroblasten zu wirken, welche daraufhin extrazelluläre Matrixproteine synthetisieren und dadurch in das Asthma-*Remodeling* involviert sind (201). Die Stickstoffmonoxid-Synthase 2 (NOS2) dagegen ist durch die Regulierung von Stickstoffmonoxid an *Remodeling*-Prozessen, aber auch der Entzündung und Atemwegsverengung beim Asthma beteiligt (202, 203). In den ALI-Epithelien von NHBEs und DHBECs konnte *NOS2* nachgewiesen werden und war nach der Behandlung mit rhIL-13 signifikant hochreguliert, sodass es bei den Vergleichen der Transkriptome zu den 25 Genen mit dem höchsten *Fold Changes* gehörte (Tab. 4.3). Die Steuerung von NOS2 findet im Wesentlichen über die Genexpression statt. Weiterhin liegt NOS2 bei Asthma in einer vermehrten Proteinmenge vor und zeigt eine höhere Aktivität (202, 204). Ein weiteres Protein, das bei Asthma nachgewiesen wurde, ist Intelectin-1 (*ITLN1*) (205, 206). Dieses Protein ist für die Initiierung der Th₂-Antwort bei Asthma essentiell, indem es die Expression von IL-25, IL-33 und TSLP reguliert (207). Die Genexpression von *ITLN1* war in ALI-Zellkulturen von NHBEs nach der rhIL-13-Behandlung signifikant erhöht (Tab. 4.3). Diese Beobachtung wurde auch schon in anderen Arbeiten gemacht und zeigt die Bedeutung von Intelectin-1 sowohl bei der Initiierung der Th₂-Antwort bei Asthma als auch bei deren Verstärkung im weiteren Verlauf der Inflammation (207-209).

Zusammengefasst kann geschlussfolgert werden, dass die Stimulation von ALI-Zellkulturen mit rhIL-13 einen Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyp mit Becherzellmetaplasie und Mukus-

Hyperproduktion generiert, der auch auf molekularer Ebene dem asthmatischen Th₂-assoziierten Atemwegsepithel *in vivo* sehr ähnelt.

Infektionen des oberen Atemwegtraktes werden in 30 bis 50 % der Fälle durch hRV, 5 bis 15 % durch Influenza-Viren und 5 bis 10 % durch RSV ausgelöst (210). Diese Viren sind außerdem für den Großteil der akuten Asthma-Exazerbationen in Kindern und Erwachsenen verantwortlich (121, 143). Die PAMPs der Viren werden durch PRRs, wie den TLRs sowie RNA-Helikasen RIG-I und MDA5, erkannt (132). Da TLR3 in den intrazellulären Endosomen von Makrophagen, dendritischen Zellen, CD8⁺ Effektor-Lymphozyten aber auch Bronchialepithelzellen exprimiert wird, war er für das in dieser Arbeit etablierte Modell von besonderer Bedeutung (211-214). TLR3 ist ein Rezeptor für dsRNA, welche während der Replikation von den meisten RNA-Viren, wie Picornaviren, RSV und Influenza A, gebildet wird (210). MDA5 und RIG-I dagegen detektieren intrazelluläre dsRNA im Zytosol der Zelle (215). Sowohl TLR3, als auch MDA5 und RIG-I werden von humanen Bronchialepithelzellen *in vitro* exprimiert (Anhang Abb. A.1). In dieser Arbeit wurde für die Induktion der antiviralen Inflammation das virale Surrogat Poly(I:C) verwendet (Kap. 4.1.3, Kap. 4.2.2). Poly(I:C) ist ein synthetisches dsRNA-Analogon und gilt als TLR3-Ligand, wird jedoch auch von MDA5 erkannt, sodass es die antivirale Inflammation *in vitro* sehr gut nachstellen kann (216-218).

TLR3-, MDA5- und RIG-I-vermittelte Signalwege sind für die Synthese von Typ I Interferonen verantwortlich und induzieren die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen während einer viralen Infektion (132, 216, 219). *In vitro* Experimente mit epithelialen Zelllinien und primären HBECs zeigten, dass Epithelzellen als Antwort auf eine Infektion mit hRV unter anderem die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α und GM-CSF sowie die Chemokine IL-8, RANTES, Eotaxin-1 und -2 produzieren. Zusätzlich konnten diese Zytokine in der nasalen Lavage nach einer hRV-Infektion nachgewiesen werden (220).

Für die Validierung der antiviralen Inflammation durch Poly(I:C) in ALI-Zellkulturen von NHBEs wurde dementsprechend die Genexpression einiger dieser infektions-assoziierten Zytokine und Chemokine untersucht (Kap. 4.1.3, Kap. 4.2.2). TNF- α und IL-6 können eine akute inflammatorische Antwort induzieren und T- sowie B-Lymphozyten aktivieren. Zusätzlich stimuliert TNF- α Makrophagen, welche für die Präsentation von Antigenen für Zellen des erworbenen Immunsystems verantwortlich sind (220). IL-6 dagegen kann unter anderem neben der inflammatorischen Antwort die Produktion von IL-13 durch CD4⁺ T-Zellen fördern

(221). Im ALI-Zellkulturmodell führte die Stimulation von NHBEs mit 5 mg/ml beziehungsweise 10 mg/ml Poly(I:C) zu einer dosisabhängigen Zunahme der Expression dieser beiden pro-inflammatorischen Zytokine bis zu einer 6-stündigen Stimulation und ging bei 12-stündiger oder 24-stündiger Stimulation wieder auf das Ausgangslevel zurück (Abb. 4.6 A, Tab. 4.1). Zusätzlich zeigte die Auswertung der Genexpressionsprofile, dass *IL-6* in ALI-Epithelien von NHBEs durch die Stimulation stark erhöht wurde, sodass es letztendlich das am zehntstärksten hochregulierte Gen war (Tab. 4.4). Diese inflammatorische Antwort stimmt mit Ergebnissen von Lever *et al.* überein. Sie zeigten, dass in ALI-Zellkulturen von NHBEs die Expression von *TNF-α* nach 24 h Stimulation mit 6 µg/ml und 12 µg/ml Poly(I:C) gefolgt von 48 h Kultivierung ohne Stimulanz um das zehnfache stieg und die Genexpression von *IL-6* konzentrationsabhängig auf das bis zu siebenfache anstieg (161). Weiterhin wurde eine stärkere Sekretion von IL-6 und *TNF-α* in ALI-Zellkulturmodellen nach Poly(I:C)-Behandlung gemessen (161, 222). Die Werte für diese Zytokine im Serum und in der nasalen Lavage von Patienten mit Influenza A-Infektion sind außerdem erhöht (223).

Zusätzlich sezerniert das Atemwegsepithel IL-8 und IP-10 als Mediatoren für die Rekrutierung von Neutrophilen beziehungsweise T-Lymphozyten und Monozyten (164, 220). *IL-8* zeigte einen konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der Genexpression ausgelöst durch die Behandlung mit Poly(I:C) (Abb. 4.6 D, Tab. 4.1). Die Genexpression von *IP-10* zeigte eine Dosisabhängigkeit, wies jedoch einen Anstieg der Expression nur bis zu einer Stimulationsdauer von 6 h auf und verringerte sich bei längerer Stimulation wieder (Abb. 4.6 C, Tab. 4.1). Zusätzlich war *IP-10* (*CXCL10*) in ALI-Zellkulturen von sowohl NHBEs als auch DHBECs das am stärksten induzierte Gen und *IL-8* (*CXCL8*) gehörte zu den 25 am stärksten exprimierten Genen nach Stimulation mit Poly(I:C) (Tab. 4.4). Die starke Induktion der Genexpression von *IL-8* nach Poly(I:C)-Gabe wurde bereits zusammen mit einer verstärkten Sekretion *in vitro* nachgewiesen (161). Wurden ALI-Epithelien von HBECs mit hRV-16 infiziert, ergab sich ein Anstieg der Genexpression von *IL-8* und eine erhöhte Synthese von IP-10 gegenüber einer unstimulierten Kontrolle (224). Es konnten weiterhin erhöhte Proteinlevel in ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBECs für IL-8 nach RSV-Infektion und erhöhte Genexpressionslevel für *IP-10* in ALI-Zellkulturen von NHBEs nach Influenza-Infektion gemessen werden (176, 184). Zusätzlich wurde in immortalisierten BEAS-2B-Zellen eine konzentrations- und zeitabhängige Erhöhung der Genexpression und des Proteinlevels von IP-10 nach Poly(I:C)-Behandlung beobachtet (225). Überdies war das IP-10-verwandte Chemokin *IP-9* (*CXCL9*) in den Genexpressionsprofilen der NHBEs und DHBECs nach Poly(I:C)-

Behandlung stark hochreguliert. Die Vergleiche der Poly(I:C)-behandelten mit den unstimulierten ALI-Epithelien zeigten, dass es bei den DHBECS auf Platz 15 aller gemessenen Gene des Arrays lag und bei den NHBECS auf Platz 47 (Tab. 4.4). Genom- und Proteinanalysen von humanen Atemwegsepithelzellen aus *in vitro* Experimenten zeigten bereits, dass IP-9 sowohl bei einer Infektion mit RSV als auch mit Influenza stark exprimiert und synthetisiert wird (226).

Ein weiteres wichtiges Chemokin, das von Epithelzellen produziert und sezerniert wird, ist der Eosinophilen und T-Lymphozyten chemotaktische Lockstoff RANTES (227). Es konnte bereits gezeigt werden, dass RANTES in ALI-Zellkulturen durch Poly(I:C) stärker exprimiert und synthetisiert wird (161). Weiterhin wurden erhöhte Level an RANTES in primären Zellkulturen von Epithelzellen nachgewiesen, welche mit RSV beziehungsweise hRV infiziert wurden (137, 228). Durch Stimulation von ALI-Epithelien mit 5 mg/ml Poly(I:C) wurde *RANTES* auch in der frühen Phase der Entzündung so stark hochreguliert, dass es bei den NHBECS auf Platz 20 und den DHBECS auf Platz 7 der am stärksten durch Poly(I:C) induzierten Gene stand (Tab. 4.4).

Weitere bereits nachgewiesene Mediatoren der antiviralen Inflammation sind IL-1 α und IL-1 β , welche beide in der frühen Phasen nach Poly(I:C)-Gabe sowohl in ALI-Zellkulturen von NHBECS als auch DHBECS stark induziert wurden (Tab. 4.4). Eine Freisetzung von IL-1 α und IL-1 β durch Epithelzellen nach einer hRV-Infektion wurde bereits *in vitro* gezeigt (229).

Ein wichtiger Bestandteil der frühen Antwort auf eine virale Infektion ist die Produktion und Freisetzung von Interferonen. TLR3 induziert die Typ I Interferone IFN- α und IFN- β sowie die Type III Interferone IFN- λ 1, IFN- λ 2 und IFN- λ 3. Aber auch die RNA-Helikasen RIG-I und MDA5 regulieren IFN- β und IFN- λ (132). Diese Interferone werden alle von Atemwegsepithelzellen exprimiert, wobei vor allem die Typ III Interferon-Antwort auf diesen Zelltyp begrenzt ist (230, 231). Der zeitliche Verlauf der Expression von *IFN- β* und *IFN- λ 1* wurde dementsprechend in Poly(I:C)-behandelten ALI-Zellkulturen von NHBECS untersucht. Beide Interferone zeigten eine konzentrationsabhängige Steigerung der Expression, wobei eine Konzentration von 1 μ g/ml Poly(I:C) keine Induktion der Genexpression bewirkte. Während die Genexpression von IFN- λ 1 die stärkste Expression nach sechs-stündiger Stimulation aufwies, war bei IFN- β bereits nach 3 h das Maximum erreicht (Abb. 4.6 B, Tab. 4.1). Die Auswertungen der Microarrays bestätigten die erhöhte Expression von *IFN- λ 1* nach Poly(I:C)-Stimulation in ALI-Epithelien von NHBECS sowie DHBECS und zusätzlich war auch *IFN- λ 2* bei beiden Spendergruppen unter den 20 am stärksten induzierten Genen zu finden (Tab. 4.4). *IFN- β* dagegen war in Poly(I:C)-

behandelten ALI-Zellkulturen von DHBECS signifikant erhöht, wohingegen die verstärkte Genexpression in NHBECS nicht signifikant war (Tab. 4.6 A, Tab. 4.7 A). Genexpressionsanalysen von primären Atemwegszellen von lungen-gesunden und asthmatischen Patienten, die mit hRV infiziert wurden, zeigten eine Induktion von *IFN-β* und *IFN-λ1* sowie *IFN-λ2* und/oder *IFN-λ3* (232). Neben den Interferonen selbst spielen zusätzlich Gene, die von ihnen induziert werden, eine wichtige Rolle während der antiviralen Antwort. Nachdem die Typ I und Typ III Interferone ihre spezifischen Rezeptoren gebunden haben, aktivieren sie den Jak-STAT-Signalweg, sodass am Ende aktiviertes STAT1/2 zusammen mit IRF-9 einen Komplex bildet, in den Zellkern transloziert und mit diesem Signal die Expression von IFN-stimulierten Genen (ISGs) induziert wird (132). Einige dieser ISGs wurden in den ALI-Epithelien von NHBECS und DHBECS nach der drei-stündigen Poly(I:C)-Gabe induziert und gehörten zu den 25 am stärksten hochregulierten Gene der Microarray-Auswertungen. Zu diesen ISGs gehörten *OASL*, *IFIT1*, *IFIT2* und *IFIT3* sowie *RSAD2* (Viperin), wobei *RSAD2* in den NHBECS nur an Stelle 40 der am stärksten durch Poly(I:C)-induzierten Gene stand und *IFIT1* und *IFIT3* bei den DHBECS an Stelle 31 beziehungsweise 28 (Tab. 4.4). *OASL* wurde auch in Genexpressionsprofilen von nasalen Epithelzellen nach einer Infektion mit hRV16 und isolierten Epithelzellen, die anschließend mit hRV16 infiziert wurden, nachgewiesen (232, 233). Weiterhin waren alle diese ISGs in ALI-Zellkulturen von humanen tracheobronchialen Epithelzellen, die mit hRV16 beziehungsweise hRV1A infiziert wurden, induziert (234). *OASL* katalysiert die Synthese von 2'-5'-verbundenen Oligoadenylaten, welche letztendlich RNasen aktivieren, sodass virale und zelluläre einzelsträngige RNA degradiert und somit die Translation und Replikation des Virus verhindert wird (235). *IFIT1*, *IFIT2* und *IFIT3* werden nach einer viralen Infektion über IFN-abhängige und unabhängige Wege induziert und inhibieren verschiedene virale Prozesse wie die Zellproliferation und Migration oder verhindern die Translation von viralen RNA-Genomen (236, 237). Viperin ist an der antiviralen Antwort beteiligt, indem es virale Proteine inhibiert, die für die Infektion benötigt werden (238). Neben der Produktion von Chemokinen und Zytokinen ist die virale Infektion zusätzlich durch morphologische Veränderungen charakterisiert, die durch das Virus ausgelöst werden. So können Viren eine erhöhte Apoptose von Atemwegszellen auslösen, wodurch die Integrität der epithelialen Barriere und somit deren Schutzfunktion zerstört wird. Diese Schutzfunktion wird zusätzlich durch das Auftrennen der *Tight Junctions* und einer fehlregulierten Wundheilung beeinträchtigt (132). Die Art der Schädigung des Epithels variiert je nach Virus. So schädigen Influenza-Viren durch zytopathische Effekte das Epithel massiv, während hRV

vor allem die Integrität der Barriere durch dysfunktionale *Tight* und *Adherens Junctions* beeinträchtigen und somit eine erhöhte Permeabilität für Allergene und Bakterien gegeben wird (120, 239, 240). Doch nicht nur hRV können die epitheliale Barriere durch fehlende Produktion von Komponenten der *Tight Junctions* auflösen, auch für Poly(I:C) wurde diese Wirkung bereits beobachtet (161, 241, 242). Um zytotoxische Effekte durch Poly(I:C) oder einen Verlust der Integrität der ALI-Epithelien von NHBEs auszuschließen, wurden diese nach der Behandlung mit Poly(I:C) zusätzlich histologisch untersucht (Abb. 4.7). PAS-Färbungen ergaben, dass bei einer Stimulationsdauer von 12 h und länger bei 5 µg/ml Poly(I:C) beziehungsweise 10 µg/ml Poly(I:C) massive Lücken im Zellverband zu beobachten waren, die auf einen Verlust der Zell-Zell-Kontakte und somit ein Auflösen der Barriere-Integrität des *in vitro* Epithels schließen ließen (Abb. 4.7). Diese Beobachtungen passen zu TEER-Messungen von Poly(I:C)-behandelten ALI-Epithelien von NHBEs. Die Ergebnisse gingen mit einer abnehmenden Zahl an zilienträgenden Zellen und verringerten Apoptose sowie einer Zunahme der Expression der Muzine und einer erhöhten Mukus-Sekretion einher (161). In den vorliegenden ALI-Epithelien konnte bei einer Inkubation länger als 12 h, mit Poly(I:C) eine Abnahme an Zilien beobachtet werden, die mit starken morphologischen Schäden des *in vitro* Epithels verbunden war (Abb. 4.7). Dies könnte mit apoptotischen Prozessen in Verbindung stehen, jedoch müsste dies weiter untersucht werden. Ab einer sechs-stündigen Behandlung mit Poly(I:C) ist zusätzlich weniger gespeicherter Mukus an der apikalen Seite zu beobachten (Abb. 4.7), jedoch müsste der Eindruck der erhöhten Mukus-Sekretion durch beispielsweise Untersuchungen der apikalen Waschungen erst noch bestätigt werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Stimulation mit Poly(I:C) im dargestellten ALI-Zellkulturmodell viele Aspekte der antiviralen Inflammation, wie sie sich *in vitro* und *in vivo* darstellen, nachstellen kann und somit als virales Surrogat für das *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation gut geeignet ist.

Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass rhIL-13 einen Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyp und Poly(I:C) eine antivirale Inflammation *in vitro* simulieren können. Im nächsten Schritt wurden diese zwei Stimulationen in einem ALI-Zellkulturmodell kombiniert, um eine Asthma-Exazerbation am Epithel *in vitro* nachzustellen. Dazu wurden 2,5 ng/ml rhIL-13 für einen Th₂-polarisierten Phänotyp mit einer etwas mildereren Becherzellmetaplasie und 5 ng/ml rhIL-13 für die schwergradige Becherzellmetaplasie verwendet. Es wurde sich für 5 µg/ml Poly(I:C)-Gabe entschieden, da bei dieser Konzentration eine antivirale Inflammation

nachgestellt werden konnte, ohne eine schwere Schädigung des Epithels zu verursachen. Überdies zeigten die Ergebnisse der Poly(I:C)-Kinetik, dass bei 3 h Stimulation inflammatorische Marker-Gene induziert wurden, jedoch diese noch nicht maximal exprimiert wurden, sodass 3 h Stimulation der frühen Phase einer epithelialen inflammatorischen Antwort auf Viren entspricht (Kap. 4.1.4, Kap. 4.2.3). Ein solches Modell ist in der aktuellen Forschung von Bedeutung, da es die Möglichkeit bietet, mit humanem Material ein *in vitro* Modell mit großer Nähe zur *in vivo* Situation zu nutzen. Die weitere Untersuchung von Asthma-Exazerbationen ist essentiell, jedoch ist die dafür notwendige experimentelle Umsetzung nicht trivial. Humane *in vivo* Studien sind vor allem bei Asthma-Exazerbationen schwer umsetzbar, da eine Infektion von asthmatischen Patienten ethisch bedenklich ist und die Messungen und Probenentnahmen schwerer umzusetzen sind. Dementsprechend sind murine Modelle und *in vitro* Modelle in der aktuellen Forschung zentrale Untersuchungssysteme. Murine *in vivo* Modelle weisen aufgrund der Physiologie und Pathologie jedoch eine Reihe von Einschränkungen auf, sodass die Übertragung auf den humanen Organismus nicht immer möglich ist (168). Es gibt strukturelle Unterschiede in der Maus wie eine monopodiale Verästelung der Bronchien und keine respiratorischen Bronchiolen, welche zu Unterschieden in der Verteilung der Atemluft führt. Weiterhin fehlt Mäusen die Fähigkeit zu Husten, was ein wichtiges Symptom bei Asthma ist (82, 168). Auf molekularer Ebene setzen Nagetiere ein anderes Muster an Mediatoren als der Mensch frei. Dies wurde bereits für Mastzellen, welche eine wichtige Rolle bei der Atemwegsentzündung spielen, nachgewiesen (168). Für die Untersuchung der Atemwege als Ziel von Viren und als potentielle Quelle für molekulare Biomarker ist das Epithel von großer Bedeutung. Dieses weist jedoch in Mäusen eine andere Zusammensetzung als im Menschen oder Primaten auf. So sind in gesunden Mäusen sekretorische Zellen zum Beispiel im Gegensatz zum humanen Atemwegsepithel kein substantieller Teil der Trachea und der Anteil an Basalzellen ist geringer (82). Somit könnte das *in vitro* ALI-Zellkulturmodell einer Asthma-Exazerbation dieser Arbeit aufgrund seiner Darstellung des humanen Atemwegsepithels, seines relativ einfachen Set-Ups und dem großen Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten ein ideales Modellsystem für eine Vielzahl an Fragestellungen sein, um die Lücke zwischen murinen *in vivo* Untersuchungen und der *in vivo* Situation im Patienten zu schließen. Um diese Rolle zu übernehmen, ist es jedoch wichtig, dass dieses Modell die *in vivo* Situation möglichst genau widerspiegelt. Dementsprechend wurden Morphologie und Genexpression des *in vitro* Modells einer

Asthma-Exazerbation dieser Arbeit zunächst mit bereits bekannten Prozessen und Mechanismen der virus-induzierten Asthma-Exazerbation verglichen.

Die virus-induzierte Asthma-Exazerbation ist unter anderem durch eine erhöhte Produktion und Sekretion von Mukus charakterisiert (134, 243). Diese erhöhte Menge an Mukus stand in der BAL von Asthmatikern, die im Rahmen einer experimentellen Infektion mit hRV-16 infiziert wurden, mit einer erhöhten Menge an MUC5AC in Verbindung (136). Im Gegensatz dazu war die Genexpression dieses Muzins im *in vitro* Exazerbationsmodell dieser Arbeit nur durch die Behandlung mit rhIL-13 induziert. Die zusätzliche Applikation von Poly(I:C) zur Induktion der Exazerbation führte zu keiner weiteren Steigerung der Genexpression von *MUC5AC*, sowohl in ALI-Epithelien von NHBEs als auch DHBEs. Auch die alleinige Stimulation mit Poly(I:C) konnte keine Induktion der Expression von *MUC5AC* auslösen (Abb. 4.8 A & Abb. 4.10 A). Außerdem war keine Veränderung im Volumen des gespeicherten Mukus zwischen alleiniger rhIL-13-Applikation und kombinierter Stimulation mit Poly(I:C) zu beobachten (Abb. 4.9, Abb. 4.11). In einem ähnlich aufgebauten *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation mit einer IL-13 Applikation von Tag 22 bis 30 und zusätzlich IL-4 von Tag 26 bis Tag 30 wurde 48 h nach der Infektion mit hRV16 auch keine erhöhte Expression von *MUC5AC* gemessen, während die Genexpression dieses Muzins durch die IL-13-IL-4-Behandlung stark induziert wurde (244). Allerdings wurde für ALI-Zellkulturen eine Induktion von *MUC5AC* durch die alleinige Gabe von Poly(I:C) oder Infektion mit hRV16 nach jeweils 48 h nachgewiesen (161, 244). Dementsprechend könnte der Zeitpunkt der Messung die Begründung für eine fehlende Induktion von *MUC5AC* im hier vorgestellten Modell sein, da zur Untersuchung der frühen Phase der Asthma-Exazerbation nur für 3 h mit Poly(I:C) stimuliert wurde.

Als nächstes wurde CCL26 untersucht, welches in schwergradigem eosinophilen Asthma eine wichtige Rolle spielt und dessen Produktion durch IL-13 induziert wird (245, 246). *CCL26* zeigte als Reaktion auf die Stimulation mit Poly(I:C) keine Veränderung der Genexpression. So ergab sich auch keine weitere Induktion der Expression von *CCL26* durch Poly(I:C) im Th₂-polarisierten Epithel (Abb. 4.8 A, Abb. 4.10 A, Tab. 4.3, Tab. 4.5). Diese Ergebnisse stimmen mit gemessenen Proteinleveln an CCL26 in IL-13-behandelten und mit hRV16 infizierten ALI-Zellkulturen von HBECs überein (247). Es wurden allerdings neben Neutrophilen auch erhöhte Anzahlen an Eosinophilen während und nach einer Virusinfektion in Atemwegen von Asthmatikern nachgewiesen (248, 249). Die Rekrutierung der Eosinophilen scheint jedoch zumindest während der frühen Phase der Asthma-Exazerbation nicht durch die Induktion von CCL26 durch Poly(I:C) im Epithel reguliert zu werden. Insgesamt scheint eine weitere Induktion

von IL-13-assoziierten Genen durch Poly(I:C) während der Exazerbation in diesem *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation nicht stattzufinden. Vergleiche der *Fold Changes* von „rhIL-13 versus unstimuliert“ und „IL-13 plus Poly(I:C) versus unstimuliert“ zeigten weitere Gene, denen eine Rolle während der asthmatischen Erkrankung zugeschrieben wird. *CLCA1*, *POSTN*, *NOS2*, *DPP4* und *SCL26A4* wurden während der nachgestellten Asthma-Exazerbation nicht weiter induziert, sondern zeigten vergleichbare *Fold Changes* wie bei der alleinigen Stimulation mit IL-13 (Tab. 4.3, Tab. 4.5). Ghebre *et al.* konnten COPD- und Asthma-Exazerbationen in drei biologische Cluster von Exazerbationen unterteilen. Ein Cluster, Cluster 3, ist vor allem bei Asthmapatienten mit virus-assoziierten Exazerbationen zu finden und durch erhöhte Level an Th₁-Mediatoren im Sputum und Serum bei gleichzeitiger Verminderung der eosinophilen Entzündung und Th₂-Mediatoren gekennzeichnet (250). Die Ergebnisse der Analyse der Th₂-assoziierten Gene des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation dieser Arbeit ergibt eine hohe Ähnlichkeit des etablierten Modells mit eben diesem Cluster 3.

In diesem virus-assoziierten Cluster 3 nach Ghebre *et al.* sind zusätzlich die Konzentrationen von IL-6 und TNF- α im Sputum während der Exazerbation gegenüber dem stabilen Zustand erhöht (250). Während IL-6 neben der inflammatorischen Antwort auch die IL-13-Produktion durch CD4⁺ T-Zellen steuern kann, ist TNF- α an der Rekrutierung von Makrophagen beteiligt (220, 221). Beide Zytokine wurden in ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBECs durch die alleinige Gabe von Poly(I:C) stark induziert. Die Genexpression von *IL-6* und *TNF- α* wurde durch die Kombination von rhIL-13 und Poly(I:C) im Vergleich zu Poly(I:C) alleine zusätzlich verstärkt (Abb. 4.8 B, Abb. 4.10 B, Tab. 4.4, Tab. 4.5). Bei Asthma-Exazerbationen von Kindern wurden im Serum erhöhte Level an IL-6 gefunden (251). In einem Mausmodell mit experimentellem Asthma wurde durch dsRNA eine Exazerbation ausgelöst und im Rahmen dieser eine erhöhte Expression von *IL-6* und *TNF- α* im Gewebe und erhöhte Proteinlevel in der BAL-Flüssigkeit ermittelt (252).

Durch die virale Infektion wird zusätzlich eine Th₁-assoziierte Immunantwort ausgelöst, deren integrale Bestandteile IL-8 und IP-10 sind. Während IL-8 bei der Rekrutierung von Neutrophilen von zentraler Bedeutung ist, spielt IP-10 als chemotaktischer Lockstoff für Lymphozyten eine Rolle (132). Nach einem Anstieg der Genexpression von *IL-8* und *IP-10* durch alleinige Stimulation mit Poly(I:C) wurde die Expression durch vorherige Behandlung mit rhIL-13 weiter signifikant erhöht (Abb. 4.8 C & E, Abb. 4.10 C & E, Tab. 4.4, Tab. 4.5). Sowohl IL-8 als auch IP-10 wurden bei Asthma-Exazerbationen mit erhöhten Leveln im Sputum

gefunden. IP-10 war dabei vor allem bei Patienten, die dem biologischen Cluster 3 nach Ghebre *et al.* zugeordnet waren, zu finden (250). Dies bestätigten Messungen der Proteinlevel von IL-8 sowie IP-10 im Serum und IP-10 im Plasma von Kindern während einer Asthma-Exazerbation (251, 253). In submersen Zellkulturen von primären pädiatrischen HBECs, die mit Th₂-Zytokinen und hRV16 stimuliert wurden, waren die Proteinlevel von IL-8, IP-10 und GM-CSF ebenfalls signifikant erhöht (254).

Ein weiteres Chemokin, welches während einer Asthma-Exazerbation in Atemwegsepithelzellen hochreguliert ist und die Eosinophilie mit reguliert, ist der Eosinophilen-Lockstoff RANTES (123, 144). Die Vergleiche der Genexpressionsprofile von stimulierten ALI-Epithelien mit unstimulierten Proben von NHBECS und DHBECS ergaben, dass RANTES einen höheren *Fold Change* bei der kombinierten Stimulation im Vergleich zur Poly(I:C)-Behandlung alleine aufwies (Tab. 4.4, Tab. 4.5). Erhöhte Level von RANTES wurden schon sehr früh in nasalen Aspiraten von Kindern mit natürlich auftretenden virus-induzierten Asthma-Exazerbationen gefunden (144). Weiterhin ist RANTES vor allem bei exazerbierten Patienten mit einer erhöhten Anzahl an Neutrophilen im Sputum hochreguliert (250).

Erwachsene haben eine erhöhte Anfälligkeit für hRV-Infektionen, in deren Verlauf die Patienten länger anhaltende Symptome und eine verminderte Lungenfunktion aufweisen (255). Dies wird mit einer fehlregulierten angeborenen Immunantwort der Interferone gegenüber viralen Infektionen bei atopischen Asthmatikern erklärt. So wurde in primären HBECs von Asthmatikern eine verringerte IFN- β - und IFN- λ -Produktion nach Infektion mit hRV im Vergleich zu HBECs von gesunden Spendern gefunden (146, 147). Auch *in vivo* wurde eine defiziente IFN- λ -Synthese in Makrophagen der BAL von hRV-infizierten Asthmatikern nachgewiesen und gezeigt, dass diese verminderte Produktion mit einigen Markern der Asthma-Exazerbation verbunden ist (147). In submersen Zellkulturen von HBECs atopischer asthmatischer Kinder, die gegenüber der Therapie mit Kortikosteroiden resistent sind, wurde eine verminderte IFN- β und IFN- λ Antwort auf verschiedene Rhinoviren sowie Poly(I:C) gefunden. Die mRNA Level korrelierten dabei negativ mit der erhöhten Viruskonzentration. In dieser Studie wurden gleichzeitig geringere mRNA-Level der entsprechenden PRRs RIG-I und MDA5 nachgewiesen (256). In dem ALI-Asthma-Exazerbationsmodell dieser Arbeit wurde sowohl in den NHBECS als auch DHBECS ein weiterer Anstieg der Genexpression für *IFN- β* als auch *IFN- λ 1* durch die Kombination aus rhIL-13 und Poly(I:C) gegenüber Poly(I:C) alleine gemessen (Abb. 4.8 D, Abb. 4.10 D). Dies wurde durch die Auswertungen der Array-Daten bestätigt, die zusätzlich für *IFN- λ 2* die gleiche Wirkung zeigten. (Tab. 4.4, Tab. 4.5).

Diese Ergebnisse sind mit denen von Contoli *et al.* übereinstimmend, da sie in ihren Zellkulturen auch einen signifikanten Anstieg der Interferone in infizierten Proben gegenüber der Kontrolle von gesunden HBECs beziehungsweise DHBECs gemessen. Im Gegensatz dazu ergab sich in einer anderen Studie beim Vergleich von hRV-infizierten gesunden HBECs mit HBECs von Asthmatikern eine Interferon-Defizienz (147). Der direkte Vergleich der rhIL-13- und Poly(I:C)-behandelten ALI-Epithelien von DHBECs mit NHBECs ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen gesund und Asthma bezüglich der *IFN-β* und *IFN-λ1* Genexpression, sprich, es ließ sich keine defiziente Interferonexpression nachweisen (Abb. 4.12 D). Dies kann zum Beispiel mit dem Messzeitpunkt nach der Gabe des Triggers zusammenhängen. Da das *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation vor allem zur Untersuchung der frühen Phase der Exazerbation genutzt werden sollte, wurde aufgrund der Ergebnisse der Poly(I:C)-Kinetiken bereits nach 3 h Stimulation mit Poly(I:C) geerntet und die Genexpression gemessen (Kap. 3.1.5). Weiterhin ist die postulierte Interferon-Defizienz bei Asthma auch heutzutage immer noch kontrovers diskutiert, da wie auch in dem hier vorgestellten *in vitro* Zellkulturmodell, in mehreren neueren Studien keine Defizienz beobachtet wurde. So fanden Sykes *et al.* in einem ähnlichen submersen Zellkulturmodell, wie es von Contoli *et al.* benutzt wurde, 8 h, 24 h und 48 h nach einer Infektion mit hRV16 und hRV1B zwar Unterschiede in der Genexpression von *IFN-β* und *IFN-λ1* bis *IFN-λ3* zwischen unstimuliert und infiziert, jedoch waren die Genexpressionslevel nach der Infektion für keinen der Zeitpunkte zwischen HBECs von gesunden und asthmatischen Spendern verschieden (257). Auch in genomweiten Arrays wurde kein Unterschied in der Interferonantwort zwischen gesund und asthmatisch nach hRV16-Infektion festgestellt (232). Ein möglicher Grund für diese kontroversen Ergebnisse könnte in der Heterogenität von Asthma mit verschiedenen Phäno- beziehungsweise Endotypen liegen. Weiterhin könnte die defiziente IFN-Produktion kein allgemeines Charakteristikum von Asthma sein, sondern mit der Atemwegsentzündung und dem Status der Kontrolle der Krankheit zusammenhängen (257). So wurde bereits gezeigt, dass die Expression von *IFN-β* mit dem Status der Atopie bei Asthma zusammenhängt (258). Insgesamt zeigen die vorgelegten Ergebnisse, dass durch eine kombinierte Stimulation mit rhIL-13 zur Induktion eines Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyps und Poly(I:C) als virales Surrogat in dem vorgestellten *in vitro* ALI-Zellkulturmodell gesunder und asthmatischer HBECs viele Aspekte der epithelialen Antwort einer Asthma-Exazerbation nachgestellt werden können.

Bisher wird versucht, durch die Gabe von Kortikosteroiden und anderen Medikamenten, Kontrolluntersuchungen und das Vermeiden von Auslösern Asthma zu kontrollieren und Exazerbationen zu vermeiden (119, 259). Allerdings ist es selbst mit einem sehr guten Asthma-Management nicht möglich, Exazerbationen bei allen Patienten zu verhindern (119). Daher besteht nach wie vor ein großer Bedarf an prädiktiven Biomarkern für Asthma-Exazerbationen. Ein guter prädiktiver Biomarker muss als wichtigstes Kriterium eine Asthma-Exazerbation frühzeitig anzeigen können, sodass in dem weiteren Verlauf der Verschlimmerung frühzeitig eingegriffen werden kann. Ein guter Biomarker muss außerdem leicht und schnell messbar sein, sodass bei Asthma-Exazerbationen Sputum und Speichel ein gutes Probenmaterial bieten würden. Dementsprechend müsste ein prädiktiver Biomarker vom Atemwegsgewebe in das Lumen sezerniert werden können. Weiterhin muss der potentielle Kandidat zusätzlich möglichst patienten-unabhängig sein. Damit ist gemeint, dass der Biomarker bei allen Patienten, die eine Asthma-Exazerbation erleiden, in der frühen Phase nachgewiesen werden kann und nicht nur zufallsabhängig bei einigen Patienten. Loureiro *et al.* konnten bereits zeigen, dass während einer Asthma-Exazerbation die Menge an Aldehyden und Alkanen sowie anderen nicht flüchtigen Metaboliten im Urin zunimmt. Diese Metabolite entstehen durch einen erhöhten oxidativen Stress während der Exazerbation (260). Reaktive Sauerstoffmetabolite wurden auch im Serum gefunden und erhöhte Level werden in Verbindung mit dem Schweregrad von Exazerbationen diskutiert (261). Wojsyk-Banaszak *et al.* haben erhöhte Temperaturen des ausgeatmeten Atems (*Exhaled Breath Temperature, EBT*) bei Kindern während der Asthma-Exazerbation nachgewiesen. Da die Werte der EBT leicht zu messen sind und das Verfahren eine nicht-invasive Methode darstellt, wäre der EBT ein guter prädiktiver Marker, wenn dieser Wert schon vor der Exazerbation einen eindeutigen Anstieg zeigen würde (262). Erst kürzlich wurde eine Signatur aus sechs Genen (*CLC*, *CPA3*, *DNASE1L3*, *ALPL*, *CXCR2* und *IL-1B*) im Sputum von Patienten mit stabilem Asthma gefunden, die die Häufigkeit für zukünftige Asthma-Exazerbationen voraussagt und die verschiedenen Phänotypen der inflammatorischen Atemwegsantwort unterscheidet (263). Auch wenn inzwischen einige potentielle Biomarker in Veröffentlichungen vorgestellt wurden, fehlt noch deren weitere Untersuchung und Validierung in der Klinik. Dementsprechend besteht weiterhin ein großer Bedarf an effektiven prädiktiven Biomarkern. Da das Epithel ein wichtiger Bestandteil der Atemwege und an immunologischen Prozessen beteiligt ist, könnte dieses eine Quelle für unterschiedliche potentielle Kandidaten darstellen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das etablierte *in vitro* Modell einer Asthma-Exazerbation dementsprechend für die Identifizierung von potentiellen epithelialen Biomarkern der frühen Phase einer virus-induzierten Asthma-Exazerbation verwendet (Kap. 4.3). Hierzu wurden ALI-Epithelien von NHBEs und DHBEs mit 5 ng/ml rhIL-13 für den Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyp und 5 µg/ml Poly(I:C) für 3 h stimuliert: Mit 5 ng/ml rhIL-13 konnten die strukturellen und molekularen Charakteristika des Th₂-polarisierten *in vivo* Epithels nachgestellt werden (Kap. 4.1.2). Bei einer Stimulation von 5 µg/ml Poly(I:C) wurden keine morphologischen Schäden bei einer Dauer von 3 h verursacht, aber eine erhöhte jedoch noch nicht maximale antivirale Inflammation induziert (Kap. 4.1.3). Die anschließend generierten Genexpressionsprofile der *in vitro* Exazerbation wurden mit den Einzelbehandlungen verglichen. Es ergab sich einer Reihe von Genen, die im *in vitro* Modell der Asthma-Exazerbation gegenüber den Einzelbehandlungen signifikant hochreguliert waren (Tab. 4.6, Tab. 4.7). Es ergaben sich jedoch keine Gene, die bei der kombinierten Stimulation mit rhIL-13 und Poly(I:C) im Vergleich mit den Einzelbehandlungen beziehungsweise der Kontrolle eine verminderte Expression und somit einen negativen *Fold Change* aufwiesen (Tab. 4.6, Tab. 4.7). Die STRING-Analyse dieser Gene ergab, dass die Proteine, deren Gene signifikant *in vitro* in der Exazerbation induziert wurden, in biologische Prozesse wie die Immunantwort, Prozesse des Immunsystems und der Abwehr von Viren involviert sind. Diese Proteine wurden zusätzlich mit Zytokin-vermittelten Signalwegen, der Antwort auf Zytokine und der Regulation der T-Zellaktivierung in Verbindung gebracht (Abb. 4.13, Abb. 4.14). Ein Großteil dieser Gene ist noch nicht vollständig charakterisiert oder deren Funktion aufgeklärt, sodass sich zu ihrer Bedeutung für biologische Prozesse in der Lunge oder der Asthma-Pathogenese bisher noch keine Aussage treffen lässt. Allerdings wurden auch einige Gene in der Auflistung der potentiellen Kandidaten gefunden, die bereits im Zusammenhang mit Asthma und Exazerbationen diskutiert wurden. Zu diesen Genen der frühen epithelialen Antwort gehörten IFN-β1, IFN-λ1 bis IFN-λ3 und einige ISGs. Wie bereits dargestellt, ist die Regulierung dieser Interferone während der Asthma-Erkrankung und damit auch Exazerbation umstritten. Die Interferonantwort scheint durch den Atopie-Status beeinflusst und somit nicht für alle Endotypen von Asthma gültig zu sein (258). Somit eignen sich die Interferone nicht als allgemeingültige prädiktive Biomarker, aber möglicherweise für einen spezifischen Phäno- oder Endotyp. Weitere Untersuchungen sind dafür notwendig. Weiterhin wurden die ISGs *IFIT1*, *IFIT2* und *IFIT3* während der Exazerbation in NHBEs und DHBEs hochreguliert (Tab. 4.6, Tab. 4.7). Deren Proteinprodukte sind im Zytoplasma lokalisiert, wo sie antivirale

Funktionen übernehmen (236). Dementsprechend eignen sie sich nicht als Biomarker, da sie im Sputum oder Serum bislang nicht nachgewiesen werden konnten. Die Lokalisation und Freisetzung der Proteine ist für einen einfachen Nachweis eines prädiktiven Biomarkers essentiell. Aus diesem Grund eignen sich auch RSAD2, DDX58 und IFIH, welche für Viperin, RIG-I und MDA5 kodieren, nicht als prädiktive Biomarker (264, 265), obwohl sie schon *in vitro* in der frühen Phase einer Asthma-Exazerbation einen Anstieg der Genexpression aufweisen (Tab. 4.6, Tab. 4.7). Ein weiteres Interferon-stimuliertes Gen ist ISG15, welches von Epithelzellen nach einer hRV-Infektion von Epithelzellen produziert wird. Das Protein konnte im Gegensatz zu den anderen ISGs in nasalen Sekreten von Patienten mit symptomatischen hRV-Infektionen nachgewiesen werden (266). *ISG15* ist sowohl in den Vergleichen der NHBEs als auch der DHBEs in der Exazerbationsgruppe beim Vergleich mit der Kontrolle, der Behandlung mit rhIL-13 beziehungsweise Poly(I:C) signifikant induziert (Tab. 4.6, Tab. 4.7). Somit ist ISG15 ein potentieller Kandidat für einen prädiktiven Biomarker. Eine weitere Funktion von ISG15 ist, dass es sowohl intrazellulär über RIG-I als auch extrazellulär die Produktion von IP-10 regulieren kann (266). Wie bereits beschrieben, ist IP-10 ein wichtiger chemotaktischer Lockstoff für Lymphozyten und wurde bereits im Serum als auch im Sputum während einer virus-induzierten Asthma-Exazerbation nachgewiesen, sodass Wark *et al.* IP-10 bereits als einen prädiktiven Marker für virus-induzierte Exazerbationen beschrieb (250, 267). Die hier erhobenen Array-Daten bestätigten, dass bereits nach 3 h die Genexpression von *IP-10* in NHBEs im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle stark anstieg. Allerdings war der *Fold Change* für den Vergleich der exazerbierten Gruppe mit der Poly(I:C)-Stimulation nicht signifikant und bei den DHBEs wurde *IP-10* nicht als potentieller Kandidat aufgeführt (Tab. 4.6, Tab. 4.7). Im Gegensatz zu den Arrays ist eine qRT-PCR jedoch viel sensitiver, sodass die Expression von *IP-10* noch einmal mit dieser Methode analysiert wurde. Die daraus resultierenden Ergebnisse wiesen eine signifikant erhöhte Expression während der Exazerbation im Vergleich zu Poly(I:C) für NHBEs auf, wohingegen in ALI-Epithelien von DHBEs dieser Effekt lediglich bei einer geringen Konzentration an rhIL-13 signifikant war (Abb. 4.8 C, Abb. 4.10 C). Zusammen mit IP-10 wurden auch erhöhte Level an IL-6 im Serum bei Kindern (251) beziehungsweise IL-6 und TNF- α im Sputum während einer virus-induzierten Exazerbation nachgewiesen (250). Beide Zytokine sind in ALI-Zellkulturen von NHBEs während der frühen epithelialen Antwort im ALI-Exazerbationsmodell gegenüber den anderen Behandlungen signifikant erhöht, jedoch ist dieser Anstieg der Genexpression von *TNF- α* sowie *IL-6* in den DHBEs gegenüber der Poly(I:C)-Behandlung nicht signifikant (Tab. 4.6,

Tab. 4.7). *TNF- α* wurde durch die qRT-PCR-Ergebnisse als potentieller Biomarker der frühen Phase der Exazerbation bestätigt. Für *IL-6* ergab sich mit dieser Methode eine Erhöhung der Genexpression, wenn auch nicht signifikant (Abb. 4.8 B, Abb. 4.10 B). Ein weiteres Protein, dass bereits im Zusammenhang mit virus-induzierten Asthma-Exazerbationen bei Kindern nachgewiesen wurde, ist der Eosinophilen-Lockstoff RANTES (144). *RANTES* (CCL5) zeigte in den Genexpressionsprofilen der NHBEs eine signifikant erhöhte Expression in den kostimulierten ALI-Epithelien im Vergleich zu *in vitro* Epithelien, die lediglich mit Poly(I:C) stimuliert wurden (Tab. 4.6). Auch für die DHBEs war eine weitere, wenn auch nicht signifikante, Zunahme der Expression von *RANTES* in den rhIL-13- und Poly(I:C)-stimulierten ALI-Zellkulturen gegenüber der Stimulation mit Poly(I:C) beziehungsweise rhIL-13 alleine messbar (Tab. 4.7). Überdies war das Monozyten chemotaktische Protein 1 (*MCP-1/CCL2*) sowohl in ALI-Epithelien von NHBEs als auch DHBEs nach der Stimulation mit rhIL-13 und Poly(I:C) im Vergleich mit den jeweiligen Einzelbehandlungen beziehungsweise im Vergleich mit unstimulierten Epithelien signifikant erhöht (Tab. 4.6, Tab. 4.7). Somit ist MCP-1 auch ein Kandidat für einen potentiellen Biomarker. MCP-1 wurde sogar bereits mit Asthma und Exazerbationen in Verbindung gebracht, da erhöhte Proteinlevel von diesem Protein im Serum von Kindern während einer Exazerbation gemessen wurde (268).

Die Genexpressionsmuster der kostimulierten *in vitro* Epithelien von NHBEs und DHBEs bestätigten somit die Relevanz einiger Proteine während der Asthma-Exazerbation *in vivo*. Für die Validierung, ob die Proteinprodukte der beschriebenen Gene sich als prädiktive Biomarker eignen, müssen weitere Untersuchungen wie Proteinkonzentrationsbestimmungen in apikalen Waschungen der Zellkulturen und in Sputumproben von Patienten folgen. In dieser Arbeit wurden vor allem die frühen Veränderungen des Transkriptoms eines differenzierten *in vitro* Atemwegsepithels untersucht. Dementsprechend müssten in einem nächsten Schritt die Proteinlevel von IL-6, IP-10, ISG15, MCP-1, RANTES und TNF- α in apikalen Waschungen des etablierten *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation gemessen werden. Mithilfe einer Kinetik der Freisetzung des jeweiligen Proteins durch das exazerbierte *in vitro* Th₂-polarisierte Epithel, wäre eine bessere Einschätzung möglich, ob sich diese Mediatoren für eine frühe Erkennung der Exazerbation auch *in vivo* eignen würden. Weiterhin müssten *in vivo* Experimente zum Nachweis dieser Kandidaten im Sputum und Speichel durchgeführt werden, um deren Potential als prädiktive Biomarker einer Asthma-Exazerbation zu bestätigen. Durch die Heterogenität von Asthma wird es jedoch schwer sein, einen einzelnen prädiktiven Biomarker für alle Endotypen zu finden. Der Vorteil der Gruppe von IL-6, IP-10, ISG15, MCP-1,

RANTES und TNF- α ist, dass sie möglicherweise durch einen kombinierten Einsatz eine Asthma-Exazerbation bei verschiedenen Endotypen frühzeitig erkennen lassen.

Zusammengefasst konnten mithilfe des *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation sechs potentielle Biomarker (IL-6, IP-10, ISG15, MCP-1, RANTES und TNF- α) identifiziert werden, die weiter untersucht werden müssen. Gleichzeitig wurde eine Vielzahl weiterer Gene ermittelt, die spezifisch in der *in vitro* Exazerbation hochreguliert wurden (Tab. 4.6 C, Tab. 4.7 C). Da die meisten dieser Gene bisher in keinem Zusammenhang mit Asthma publiziert wurden, wäre es interessant deren mögliche Funktion oder Rolle in der Asthma-Exazerbation zu untersuchen.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen die Relevanz eines differenzierten Epithels für die zu untersuchende Fragestellung. So sind submerse Zellkulturen für die Untersuchung von Basalzellen gut geeignet, da diese hauptsächlich aus diesem Zelltyp bestehen. Jedoch ist dieses Zellkultursystem bei der Untersuchung von spezifischen Zelltypen des *in vivo* Atemwegsepithels und der Antwort auf verschiedene Umweltfaktoren und Pathogene nicht ausreichend (153). Vor allem bei Experimenten mit Viren ist ein ausdifferenziertes Epithel essentiell, da die Viren vor allem über zilientragende Zellen das Epithel infizieren (269). Weiterhin ist bei der Untersuchung einer Asthma-Exazerbation der Th₂-polarisierte epitheliale Phänotyp für eine möglichst realistische *in vivo* Nachstellung wichtig, da die Becherzellmetaplasie und Mukus-Hypersekretion ein charakteristisches Merkmal des asthmatischen Atemwegsepithels sind (73, 75). Dieser Phänotyp konnte während der vierwöchigen Differenzierung der DHBEs nicht nachgestellt werden (Abb. 4.3, Abb. 4.5). Diese Beobachtung stimmt mit Vergleichen von ALI-Zellkulturen von NHBEs und DHBEs von Hackett *et al.* überein (184). Durch die Stimulation mit rhIL-13 von Tag 21 bis Tag 28 war es möglich, eine Becherzellmetaplasie und Hyperproduktion an Mukus zu induzieren. Allerdings war die Wirkung dieses Th₂-Mediators auf die Genexpression von *MUC5AC* sowie *CCL26* und die Morphologie der ALI-Epithelien von NHBEs und DHBEs identisch (Abb. 4.4, Abb. 4.5). Dementsprechend konnte rhIL-13 in den NHBEs sowie DHBEs einen Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyp induzieren. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied, ob Zellen von lungen-gesunden oder asthmatischen Spendern verwendet wurden. Der direkte Vergleich der Wirkung von IL-13 auf NHBEs und DHBEs wurde bisher kaum untersucht. In den meisten Studien wurden NHBEs verwendet und mit IL-13 stimuliert (175, 247). Es gibt jedoch eine veröffentlichte Arbeit in der NHBEs und DHBEs von Kindern mit verschiedenen Konzentrationen an IL-13 in einem vergleichbaren Protokoll des zeitlichen Verlaufs wie in

dieser Arbeit stimuliert wurden. Allerdings stehen die Ergebnisse dieser Studie im Widerspruch zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit. In ALI-Zellkulturen der pädiatrischen HBECs ergaben sich signifikante Unterschiede im unstimulierten Zustand und bei der Stimulation mit 2 ng/ml beziehungsweise 20 ng/ml IL-13 in der *MUC5AC*-Genexpression und dem Anteil an Becherzellen zwischen NHBECs und DHBECs. Beides war sowohl in den unstimulierten als auch IL-13-behandelten ALI-Zellkulturen von DHBECs signifikant höher als in denen von NHBECs (270). Einen signifikant höheren Anteil der Becherzellen in ALI-Epithelien von pädiatrischen DHBECs im Vergleich zu pädiatrischen NHBECs hatten auch schon Parker *et al.* beobachtet (177). Diese gegensätzlichen Ergebnisse könnten durch den Ursprung der DHBECs hervorgerufen werden. So wurden in der vorliegenden Arbeit kommerzielle primäre HBECs verwendet, welche von erwachsenen Spendern stammten. Gegen dieses Argument spricht, dass Hackett *et al.* auch 50 % pädiatrische DHBECs verwendete (184). Da Asthma eine sehr heterogene Erkrankung ist und keine genaueren Informationen über den Endotyp oder den Schweregrad der asthmatischen Erkrankung für die in dieser Arbeit verwendeten Spender vorliegen, könnte die Heterogenität der Spender die Ursache sein. Sowohl im unstimulierten Zustand als auch bei den verschiedenen Stimulationen wurden für die ALI-Zellkulturen der DHBECs jeweils eine große Streuung der Werte festgestellt. So zeigten einige ALI-Epithelien von asthmatischen Spendern einen höheren Anteil an Becherzellen im unstimulierten Zustand nach 28 Tagen Differenzierung, jedoch waren einige *in vitro* Epithelien mit der Morphologie der NHBECs vergleichbar, wodurch letztendlich keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen wurden (Abb. 4.5).

Die starke Streuung innerhalb der DHBECs zeigte sich auch bei der Stimulation mit Poly(I:C) (Kap. 4.1.4). Während das Th₂-polarisierte Epithel der DHBECs und NHBECs keine Unterschiede in der Morphologie und Expression der ausgewählten Gene aufwies, zeigten sich mit Poly(I:C) deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Zur Nachstellung der Exazerbation wurden ALI-Zellkulturen mit rhIL-13 und Poly(I:C) stimuliert und die Messung der Expression von Asthma-Exazerbations-assoziiierter Gene ergab, dass die Genexpression von *TNF-α*, *IL-6*, *IP-10*, *IFN-β*, *IFN-λ1* und *IL-8* in den NHBECs gegenüber alleiniger Stimulation mit Poly(I:C) signifikant erhöht waren (Abb. 4.8 B–E). Währenddessen wurde in den DHBECs nur für *TNF-α*, *IP-10* und *IFN-β* ein signifikanter Anstieg der Genexpression ermittelt. Für die anderen Gene wurden jeweils deutlich erhöhte Mittelwerte in der Exazerbationsgruppe berechnet, jedoch waren diese aufgrund der Heterogenität der asthmatischen Spender nicht

signifikant (Abb. 4.10). Der direkte Vergleich von exazerbierten ALI-Zellkulturen der DHBECS mit denen der NHBECS ergab für *TNF- α* und *IP-10* signifikant erhöhte Expressionslevel und auch für die anderen exazerbations-relevanten Gene ergaben sich, wenn auch nicht signifikante, so doch erhöhte Werte in den ALI-Epithelien der DHBECS (Abb. 4.12). Diese Ergebnisse zeigen, dass es relevante Unterschiede zwischen NHBECS und DHBECS gibt, die zu einer stärkeren Entzündung in ALI-Zellkulturen von DHBECS führen. Meines Wissens nach wurde bisher keine Studie veröffentlicht, in der NHBECS mit DHBECS in diesem experimentellen Aufbau miteinander verglichen wurden. In der einzigen mir bekannten Arbeit, in der DHBECS und NHBECS mit IL-13 stimuliert wurden, wurde lediglich die Morphologie hinsichtlich einer Becherzellmetaplasie untersucht und keine antivirale Inflammation oder Asthma-Exazerbation (270). Zwar wurden signifikant erhöhte Proteinlevel an IL-6, IL-1 α , IP-10 und RANTES in hRV16-infizierten ALI-Zellkulturen von NHBEs beziehungsweise DHBECS nach 48 h ermittelt, jedoch waren diese Level in den infizierten ALI-Epithelien von NHBECS und DHBECS nicht unterschiedlich (224). Auch in ALI-Epithelien von NHBECS und DHBECS, die mit RSV infiziert wurden, wurden 48 h nach der Infektion lediglich für IL-8 signifikante Unterschiede zwischen NHBECS und DHBECS ermittelt. 96 h nach der Infektion war eine erhöhte Freisetzung in den ALI-Zellkulturen der DHBECS gegenüber der NHBECS auch für IL-6 und GM-CSF nachweisbar (184). Für einen besseren Vergleich des in dieser Arbeit etablierten *in vitro* Modells einer Asthma-Exazerbation mit bisherigen ALI-Zellkultursystem zur Untersuchung der antiviralen Inflammation in Asthma wäre die Messung der Proteinproduktion in den exazerbierten ALI-Epithelien und deren Freisetzung wichtig. Jedoch zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass zum einen die Induktion eines Th₂-polarisierten epithelialen Phänotyps in Kombinationen mit einem Auslöser für die antivirale Inflammation der Asthma-Exazerbation *in vivo* am stärksten ähnelt. Gleichzeitig zeigt der Vergleich der NHBECS und DHBECS auch Unterschiede, die erst nach der Stimulation mit Poly(I:C) oder rhIL-13 zusammen mit Poly(I:C) zu unterschiedlichen Genexpressionsprofilen führen. Diese Unterschiede können durch genetische Mutationen wie Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) verursacht werden, deren Lokalisierung sich mit den Sonden der Arrays beziehungsweise Primern der qRT-PCR nicht überlagern, sodass sie mit diesen Methoden nicht detektierbar sind. Es konnten bereits mehrere dieser genetischen Veränderungen mit einer erhöhten Anfälligkeit für Asthma in Verbindung gebracht werden (158). So führt der SNP Arg110Gln im IL-13-Gen zu einer IL-13-Variante, welche mit einer geringeren Affinität an die IL-13R α 2-Kette bindet, und erhöhte Konzentrationen davon im

Plasma vorliegen (271). Polymorphismen in der IL-4R α -Kette dagegen führen zu einer erhöhten Anfälligkeit für allergische Erkrankungen (272). Außerdem wurden Polymorphismen in den Genen für IL-33, IL-1RL1 und TSLP gefunden, die alle mit der Aktivierung des Epithels, dessen Schädigung und der Th₂-dominierten Immunantwort in Verbindung stehen (84). Neben Polymorphismen sind auch epigenetische Veränderungen mögliche Modulatoren für eine erhöhte Asthma-Suszeptibilität. So wurden bei Kindern mit Asthma verschiedene Methylierungsstellen in der DNA gefunden, die mit Signalwegen von Asthma-relevanten Immunprozessen wie zum Beispiel der Aktivierung von Eosinophilen und zytotoxischen T-Zellen in Verbindung gebracht wurden (273, 274). Weiterhin wurde gezeigt, dass Regionen des humanen CCL26-Promotors in primären Epithelzellen von allergischen Patienten hypomethyliert sind und diese geringere Methylierung mit einer erhöhten CCL26 Expression korreliert (275). Die SNPs und Methylierungen an den Methylierungsstellen können auch interagieren und dadurch das Risiko einer Asthma-Erkrankung zu entwickeln erhöhen (276). Da sich die Genexpressionsprofile der NHBEs und DHBEs dieser Arbeit bei den unterschiedlichen Stimulationen kaum unterschieden und somit die Unterschiede während der Asthma-Exazerbation *in vitro* nicht erklären können, könnten epigenetische Veränderungen für die stärkere Entzündungsreaktion in den exazerbierten ALI-Zellkulturen der DHBEs verantwortlich sein. Dementsprechend werden als nächster Schritt Methylomanalysen durchgeführt und die daraus resultierenden Methylierungsmuster der NHBEs und DHBEs im unstimulierten Zustand, nach rhIL-13-Stimulation, Poly(I:C)-Behandlung und während der frühen Phase der Asthma-Exazerbation *in vitro* miteinander verglichen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit ein *in vitro* ALI-Zellkulturmodell zur Nachstellung einer Asthma-Exazerbation mit dem viralen Surrogat Poly(I:C) etabliert werden, welches dem *in vivo* Zustand des humanen Bronchialepithels sowohl morphologisch als auch immunologisch sehr ähnlich ist. Mit Hilfe dieses *in vitro* Modells einer Exazerbation konnten sechs Kandidaten identifiziert werden, die sich als potentielle prädiktive Biomarker für weitere Validierungsuntersuchungen einer Asthma-Exazerbation anbieten.

Das hier etablierte ALI-Zellkulturmodell bietet außerdem die Möglichkeit, mechanistische Untersuchungen zur Rolle des Atemwegsepithels bei der Entstehung von Asthma-Exazerbationen durchzuführen, wie zum Beispiel epigenetischer Modifikationen der Gene von exazerbations-relevanten Faktoren.

6 Literaturverzeichnis

1. The Global Asthma Network. The Global Asthma Report 2018. Internetseite: <http://www.globalasthmareport.org/Global%20Asthma%20Report%202018.pdf>.
2. Reddel HK, Bateman ED, Becker A, Boulet LP, Cruz AA, Drazen JM, Haahtela T, Hurd SS, Inoue H, de Jongste JC, Lemanske RF, Levy ML, O'Byrne PM, Paggiaro P, Pedersen SE, Pizzichini E, Soto-Quiroz M, Szefer SJ, Wong GWK, FitzGerald JM. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur Respir J*. 2015;46(3):622-39.
3. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy*. 2004;59:469-78.
4. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, Coulet LP. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. 2012;12:204.
5. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Revised 2002. Internetseite: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/01/2002-GINA.pdf>.
6. Johansson SGO, O'B Hourihane J, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wüthrich B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56:813-24.
7. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *The Lancet*. 2006;368(9537):804-13.
8. Agache I, Akdis C, Jutel M, Virchow JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*. 2012;67(7):835-46.
9. National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute (US). National asthma education and prevention program. Bethesda (MD): Section 2, Definition, Pathophysiology and pathogenesis of asthma, and natural history of asthma. Third Expert panel on the diagnosis and management of asthma. 2007.
10. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. Allergy Asthma & Immunol*. 2000;85(1):9-21.
11. Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *New Engl J Med*. 2001;344(5):350-62.
12. Schaub B, Lauener R, von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(5):969-77.
13. Eder W, Ege MJ, Von Mutius E. The asthma epidemic. *New Engl J Med*. 2006;355(21):2226-35.

14. Gern JE, Lemanske RF, Busse WW. Early life origins of asthma. *J Clin Invest.* 1999;104(7):837-43.
15. Illi S, Von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ.* 2001;322(7283):390-5.
16. Huss K, Adkinson NF, Jr., Eggleston PA, Dawson C, Van Natta ML, Hamilton RG. House dust mite and cockroach exposure are strong risk factors for positive allergy skin test responses in the Childhood Asthma Management Program. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(1):48-54.
17. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TAE, Cogswell JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p1) and the development of asthma in childhood. *New Engl J Med.* 1990;323(8):502-7.
18. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(5):1501-7.
19. Gern JE, Busse WW. Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(2):132-8.
20. Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(6):1139-46.
21. Ober C. Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(2):274-8.
22. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, D'Agostina R, Castro M, Curran-Everett D, Firtzpatrick AM, Gaston B, Jarjour NN, Sorkness R, Calhoun WJ, Chung KF, Dweik, RA, Israel E, Peters SP, Busse WW, Exzorum SC, Bleecker ER, National Heart, Lung, Blood Institute's Severe Asthma Research Programm. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(4):315-23.
23. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(1):101-8.
24. Hammad H, Lambrecht BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(2):331-6.
25. Lambrecht BN, Hammad H. The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet.* 2010;376:834-43.
26. Riese RJ, Chapman HA. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Current Opinion in Immunology.* 2000;12:107-13.

27. Plantinga M, Guillems M, Vanheerswynghe M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, Vanhoutte L, Neyt K, Killeen N, Malissen B, Hammad H, Lambrecht BN. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity*. 2013;38(2):322-35.
28. Williams JW, Tjota MY, Clay BS, Vander Lugt B, Bandukwala HS, Hrusch CL, Tjota MY, Clay BS, Vander Lugt B, Bandukwala HS, Hrusch CL, Decker DC, Blaine KM, Fixsen BR, Singh H, Sciammas R, Sperling AI. Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat Commun*. 2013;4:2990.
29. León B. T Cells in Allergic Asthma: Key players beyond the Th2 pathway. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17(7):43.
30. Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, Qin FY, Yao Z, Cao W, Liu YJ. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med*. 2005;202(9):1213-23.
31. Chu DK, Llop-Guevara A, Walker TD, Flader K, Goncharova S, Boudreau JE, Moore CL, Seunghyun In T, Wasserman S, Coyle AJ, Kolbeck R, Humbles AA, Jordana M. IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(1):187-200.
32. Hoshino A, Tanaka Y, Akiba H, Asakura Y, Mita Y, Sakurai T, Takaoka A, Nakaike S, Ishii S, Sugamura K, Yagita H, Okumura K. Critical role for OX40 ligand in the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *Eur J Immunol*. 2003;33:861-9.
33. Humrich JY, Humrich JH, Auerbeck M, Thumann P, Termeer C, Kampgen E, Schuler G, Jenne L. Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration. *Immunology*. 2006;117(2):238-47.
34. Larché M, Till SJ, Haselden BM, North J, Barkans J, Corrigan CJ, Kay AB, Robinson DS. Costimulation through CD86 is involved in airway antigen-presenting cell and T cell responses to allergen in atopic asthmatics. *J Immunol*. 1998;161(11):6375-82.
35. van Rijt LS, Vos N, Willart M, Kleinjan A, Coyle AJ, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(1):166-73.
36. Ho IC, Tai TS, Pai SY. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(2):125-35.
37. Flynn S, Toellner K-M, Raykundalia C, Goodall M, Lane P. CD4 T cell cytokine differentiation: The B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *J Exp Med*. 1998;188(2):297-304.
38. Schmitz N, Kurrer M, Kopf M. The IL-1 receptor 1 is critical for Th2 cell type airway immune responses in a mild but not in a more severe asthma model. *Eur J Immunol*. 2003;33:991-1000.

39. Dragon S, Rahman MS, Yang J, Unruh H, Halayko AJ, Gounni AS. IL-17 enhances IL-1 β -mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(4):L1023-9.
40. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(6):872-97.
41. Garcia G, Godot V, Humbert M. New chemokine targets for asthma Therapy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005;5:155-60.
42. Kallinich T, Schmidt S, Hamelmann E, Fischer A, Qin S, Luttmann W, Virchow JC, Krocze RA. Chemokine-receptor expression on T cells in lung compartments of challenged asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(1):26-33.
43. Kay AB. The Role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy*. 2006;91:59-75.
44. Ryu HJ, Jung HY, Park JS, Ryu GM, Heo JY, Kim JJ, Moon SM, Kim HT, Lee JY, Koh I, Kim JW, Rho JK, Han BG, Kim H, Park CS, Oh B, Park C, Lee JK, Kimm K. Gene-based single nucleotide polymorphisms and linkage disequilibrium patterns of 29 asthma candidate genes in the chromosome 5q31-33 region in Koreans. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;139(3):209-16.
45. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):838-48.
46. Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DAA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle N. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*. 1996;380:630-3.
47. Reuter S, Stassen M, Taube C. Mast cells in allergic asthma and beyond. *Yonsei Med J*. 2010;51(6):797-807.
48. Murray JJ, Tonnel AB, Brash AR, Roberts JA, Gosset P, Workman R, Capron A, Oates JA. Release of Prostaglandin D2 into human airways during actue antigen challenge. *N Engl J Med*. 1986;315(13):800-4.
49. Casale TB, Wood D, Richerson HB, Zehr B, Zavala D, Hunninghake GM. Direct evidence of a role of mast cells in the pathogenesis of antigen-induced bronchoconstriction. *J Clin Invest*. 1987;80:1507-11.
50. Liu MC, Hubbard WC, Proud D, Stealey BA, Galli SJ, Kagey-Sobotka A, Bleecker ER, Lichtenstein LM. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics: Cellular, mediator, permeability changes. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144(1):51-8.
51. Thomas PS, Heywood G. Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax*. 2002;57:774-8.
52. Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Tumor Necrosis Factor- α increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(1):76-80.

53. Cembrzynska-Nowak M, Szklarz E, Inglot AD, Teodorczyk-Injeyan JA. Elevated release of Tumor Necrosis Factor-alpha and Interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(2):291-5.
54. Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med*. 2005;11(4):148-52.
55. Lemiere C, Ernst P, Olivenstein R, Yamauchi Y, Govindaraju K, Ludwig MS, Martin LG, Hamid Q. Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: eosinophilic and noneosinophilic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(5):1033-9.
56. Robinson DS, North J, Zeibecoglou K, Ying S, Meng Q, Rankin S, Hamid Q, Tavernier J, Kay AB. Eosinophil development and bone marrow and tissue eosinophils in atopic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;118:98-100.
57. Sehmi R, Dorman S, Baatjes A, Watson R, Foley R, Ying S, Robinson DS, Kay AB, O'Byrne PM, Denburg JA. Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34+ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. *Immunology*. 2003;109:536-46.
58. Ackerman SJ, Bochner BS. Mechanisms of eosinophilia in the pathogenesis of hypereosinophilic disorders. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27(3):357-75.
59. Kariyawasam HH, Robinson DS. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006;27(2):117-27.
60. Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D. Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:S113-7.
61. Awadh N, Muller N, Park C, Abboud R, FitzGerald J. Airway wall thickness in patients with near fatal asthma and control groups: assessment with high resolution computed tomographic scanning. *Thorax*. 1998;53(4):248-53.
62. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989;1(8637):520-4.
63. Altraja A, Laitinen A, Virtanen I, Kämpe M, Simonsson BG, Karlsson SE, Hakansson L, Venge P, Sillastu H, Laitinen LA. Expression of laminins in the airways in various types of asthmatic patients: a morphometric study. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;15(4):482-8.
64. Laitinen A, Altraja A, Kämpe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:951-8.
65. Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(6):676-80.
66. Boulet L-P, Laviolette M, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Malo J-L, Boutet M. Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest*. 1997;112(1):45-52.

67. Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, Hamid Q. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17(3):326-33.
68. Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma: A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(3):720-6.
69. James AL, Elliot JG, Jones RL, Carroll ML, Mauad T, Bai TR, Abramson MJ, McKay KO, Green FH. Airway Smooth Muscle Hypertrophy and Hyperplasia in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(10):1058-64.
70. Robinson DS. The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle? *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(1):58-65.
71. Xie S, Sukkar MB, Issa R, Khorasani NM, Chung KF. Mechanisms of Induction of Airway Smooth Muscle Hyperplasia by Transforming Growth Factor- β . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293(1):L245-L53.
72. Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:229-33.
73. Wadsworth SJ, Jasmine Yang S, Dorscheid DR. IL-13, asthma and glycosylation in airway epithelial repair. *Carbohydrates - Comprehensive studies on glycobiology and glycotechnology.* INTECH Open Access Publisher. 2012. p.187-228.
74. Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V, Kang MJ, Cohn L, Kim YK, McDonald DM, Elias JA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med.* 2004;10(10):1095-103.
75. Erle DJ, Sheppard D. The cell biology of asthma. *J Cell Biol.* 2014;205(5):621-31.
76. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology.* 2003;8:432-46.
77. Roche WR, Montefort S, Baker J, Holgate ST. Cell adhesion molecules and the bronchial epithelium. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:S79-S82.
78. Rock JR, Randell SH, Hogan BL. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech.* 2010;3(9-10):545-56.
79. Ayers MM, Jeffery PK. Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *Eur Respir J.* 1988;1:58-80.
80. Nettekheim P, Koo JS, Gray T. Regulation of differentiation of the tracheobronchial epithelium. *Journal of Aerosol Medicine.* 2000;13(3):207-18.
81. Philippou S, Sommerfeld HJ, Wiese M, Morgenroth K. The morphological substrate of autonomic regulation of the bronchial epithelium. *Virchows Archiv A Pathol Anat.* 1993;423:469-76.

82. Hyde DM, Miller LA, Schelegle ES, Fanucchi MV, Van Winkle LS, Tyler NK, Advalovic MV, Evans MJ, Kajekar R, Buckpitt AR, Pinkerton KE, Joad JP, Gershwin LJ, Wu R, Plopper CG. Asthma: a comparison of animal models using stereological methods. *European Respiratory Review*. 2006;15(101):122-35.
83. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:459-86.
84. Loxham M, Davies DE. Phenotypic and genetic aspects of epithelial barrier function in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(6):1736-51.
85. Tsukita S, Furuse S, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(4):285-93.
86. Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;36:166-76.
87. Ivanov AI, Naydenov NG. Dynamics and regulation of epithelial adherens junctions: recent discoveries and controversies. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013;303:27-99.
88. Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(3):572-87.
89. Nievers MG, Schaapveld QJ, Sonnenberg A. Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biology*. 1999;18:5-17.
90. Kast JI, Wanke K, Soyka MB, Wawrzyniak P, Akdis D, Kingo K, Rebane A, Akdis CA. The broad spectrum of interepithelial junctions in skin and lung. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(2):544-7.
91. Swindle EJ, Collins JE, Davies DE. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):23-34.
92. Keenan KP, Combs JW, McDowell EM. Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury. III. Large and small lesions: Comparative stathmokinetic and single pulse and continuous thymidine labeling autoradiographic studies. *Virchows Arch Cell Pathol*. 1982;41:231-52.
93. Denney L, Byrne AJ, Shea TJ, Buckley JS, Pease JE, Herledan GM, Walker SA, Gregory LG, Lloyd CM. Pulmonary epithelial cell-derived cytokine TGF-beta1 is a critical cofactor for enhanced innate lymphoid cell function. *Immunity*. 2015;43(5):945-58.
94. Mayer AK, Bartz H, Fey F, Schmidt LM, Dalpke AH. Airway epithelial cells modify immune responses by inducing an anti-inflammatory microenvironment. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1689-99.
95. Saatian B, Rezaee F, Desando S, Emo J, Chapman T, Knowlden S, Georas SN. Interleukin-4 and interleukin-13 cause barrier dysfunction in human airway epithelial cells. *Tissue Barriers*. 2013;1(2):e24333.

96. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med*. 2012;18(5):684-92.
97. Park KS, Korfhagen TR, Bruno MD, Kitzmiller JA, Wan H, Wert SE, Khurana Hershey GK, Chen G, Whitsett JA. SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. *J Clin Invest*. 2007;117(4):978-88.
98. Chen G, Korfhagen TR, Xu Y, Kitzmiller J, Wert SE, Maeda Y, Gregorieff A, Clevers H, Whitsett JA. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. *J Clin Invest*. 2009;119(10):2914-24.
99. Sivaprasad U, Askew DJ, Ericksen MB, Gibson AM, Stier MT, Brandt EB, Bass SA, Gaines MO, Chakir J, Stringer KF, Wert SE, Whitsett JA, Le Cras TD, Wills-Karp M, Silverman GA, Khurana Hershey GK. A nonredundant role for mouse Serpinb3a in the induction of mucus production in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(1):254-61, 61 e1-6.
100. Lachowicz-Scroggins ME, Yuan S, Kerr SC, Carrington SD, Fahy JV. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B protein in airway mucus in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(10):1296-9.
101. Takeyama K, Fahy JV, Nadel JA. Relationship of epidermal growth factor receptor to goblet cell production in human bronchi. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(2):511-6.
102. Kondo M, Tamaoki J, Takeyama K, Nakata J, Nagai A. Interleukin-13 induces goblet cell differentiation in primary cell culture from guinea pig tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27(5):536-41.
103. Vermeer PD, Harson R, Einwalter LA, Moninger T, Zabner J. Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(3):286-95.
104. Thomas B, Rutman A, Hirst RA, Haldar P, Wardlaw AJ, Bankart J, Brightling CE, O'Callaghan C. Ciliary dysfunction and ultrastructural abnormalities are features of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(4):722-9.
105. Nadel JA. Mucous hypersecretion and relationship to cough. *Pulm Pharmacol Ther*. 2013;26(5):510-3.
106. Kiwamoto T, Katoh T, Evans CM, Janssen WJ, Brummet ME, Hudson SA, Zhu Z, Tiemeyer M, Bochner BS. Endogenous airway mucins carry glycans that bind Siglec-F and induce eosinophil apoptosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5):1329-40 e9.
107. Sidhu SS, Yuan S, Innes AL, Kerr S, Woodruff PG, Hou L, Muller SJ, Fahy JV. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14170-5.
108. Erzurum SC. New insights in oxidant biology in asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13 (Suppl 1):S35-9.

109. Ivanova JI, Bergman R, Birnbaum HG, Colice GL, Silverman RA, McLaurin K. Effect of asthma exacerbations on health care costs among asthmatic patients with moderate and severe persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(5):1229-35.
110. Lane S, Molina J, Plusa T. An international observational prospective study to determine the cost of asthma exacerbations (COAX). *Respir Med.* 2006;100(3):434-50.
111. Lloyd A, Price D, Brown R. The impact of asthma exacerbations on health-related quality of life in moderate to severe asthma patients in the UK. *Prim Care Respir J.* 2007;16(1):22-7.
112. Krishnan V, Diette GB, Rand CS, Bilderback AL, Merriman B, Hansel NN, Krishnan JA. Mortality in patients hospitalized for asthma exacerbations in the United States. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(6):633-8.
113. Bai TR, Vonk JM, Postma DS, Boezen HM. Severe exacerbations predict excess lung function decline in asthma. *Eur Respir J.* 2007;30(3):452-6.
114. Moore WC, Bleecker ER, Curran-Everett D, Erzurum SC, Ameredes BT, Bacharier L, Calhoun WJ, Castro M, Chung KF, Clark MP, Dwork RA, Fitzpatrick AM, Gaston B, Hew M, Hussain I, Jarjour NN, Israel E, Levy BD, Murphy JR, Peters SP, Teague WG, Meyers DA, Busse WW, Wenzel SE, National Heart, Lung and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(2):405-13.
115. Miller MK, Lee JH, Miller DP, Wenzel SE, Group TS. Recent asthma exacerbations: a key predictor of future exacerbations. *Respir Med.* 2007;101(3):481-9.
116. Virchow JC, Backer V, de Blay F, Kuna P, Ljorring C, Prieto JL, Villesen HH. Defining moderate asthma exacerbations in clinical trials based on ATS/ERS joint statement. *Respir Med.* 2015;109(5):547-56.
117. Fuhlbrigge A, Peden D, Apter AJ, Boushey HA, Camargo CA, Jr., Gern J, Heymann PW, Martinez FD, Mauger D, Teague WG, Blaisdell C. Asthma outcomes: Exacerbations. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(3 Suppl):S34-48.
118. Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, Casale TB, Chanez P, Enright PL, Gibson PG, de Jongste JC, Kerstjens HA, Lazarus SC, Levy ML, O'Byrne PM, Partridge MR, Pavord ID, Sears MR, Sterk PJ, Stolf SW, Sullivan SD, Szeffler SJ, Thomas MD, Wenzel SE, American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma, Control and Exacerbations. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Asthma control and exacerbations. Standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(1):59-99.
119. Castillo JR, Peters SP, Busse WW. Asthma exacerbations: pathogenesis, prevention, and treatment. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(4):918-27.
120. Singh AM, Busse WW. Asthma exacerbations. 2: aetiology. *Thorax.* 2006;61(9):809-16.

121. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Tolle S, Myint SH, Tyrrell DAJ, Holgate ST. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ*. 1995;310:1225-9.
122. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ*. 1993;307(6910):982-6.
123. Jackson DJ, Johnston SL. The role of viruses in acute exacerbations of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(6):1178-87; quiz 88-9.
124. Kim CK, Callaway Z, Gern JE. Viral infections and associated factors that promote acute exacerbations of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2018;10(1):12-7.
125. Atmar RL, Guy E, Guntupalli KK, Zimmermann JL, Brandi VD, Baxter BD, Greenberg SB. Respiratory tract viral infections in inner-city asthmatic adults. *Arch Intern Med*. 1998;158(22):2453-9.
126. McErlean P, Greiman A, Favoreto S, Jr., Avila PC. Viral diversity in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010;30(4):481-95.
127. Nathan RA, Geddes D, Woodhead M. Management of influenza in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;87(6):447-54.
128. Cunningham AF, Johnston SL, Julious SA, Lampe FC, Ward ME. Chronic Chlamydia pneumoniae infection and asthma exacerbations in children. *European Respiratory Journal*. 1998;11(2):345-9.
129. Miyashita N, Kubota Y, Nakajima M, Niki Y, Kawane H, Matsushima T. Chlamydia pneumoniae and exacerbations of asthma in adults. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998;80(5):405-9.
130. Dougherty RH, Fahy JV. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(2):193-202.
131. Bjornson CL, Mitchell I. Gender differences in asthma in childhood and adolescence. *J Gend Specif Med*. 2000;3(8):57-61.
132. Varelle M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):210-29.
133. Grünberg K, Sharon RF, Hiltermann TJ, Brahim JJ, Dick EC, Sterk PJ, van Krieken JH. Experimental rhinovirus 16 infection increases intercellular molecule-1 expression in bronchial epithelium of asthmatics regardless of inhaled steroid treatment. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(7):1015-23.
134. Friedlander SL, Busse WW. The role of rhinovirus in asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(2):267-73.
135. Zhu L, Lee PK, Lee WM, Zhao Y, Yu D, Chen Y. Rhinovirus-induced major airway mucin production involves a novel TLR3-EGFR-dependent pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;40(5):610-9.

136. Hewson CA, Haas JJ, Bartlett NW, Message SD, Laza-Stanca V, Keadze T, Caramori G, Zhu J, Edbrooke MR, Stanciu LA, Kon OM, Papi A, Jeffery PK, Edwards MR, Johnston SL. Rhinovirus induces MUC5AC in a human infection model and in vitro via NF-kappaB and EGFR pathways. *Eur Respir J*. 2010;36(6):1425-35.
137. Schroth MK, Grimm F, Frindt P, Galagan DM, Konno SI, Love R, Gern JE. Rhinovirus replication causes RANTES production in primary bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20(6):1220-8.
138. Papadopoulos NG, Papi A, Meyer J, Stanciu LA, Salvi S, Holgate ST, Johnston SL. Rhinovirus infection up-regulates eotaxin and eotaxin-2 expression in bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(7):1060-6.
139. Gern JE, Vrtis R, Grindle KA, Swenson C, Busse WW. Relationship of upper and lower airway cytokines to outcome of experimental rhinovirus infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(6):2226-31.
140. Fleming HE, Little FF, Avila PC, Wong H, Liu J, Yagi S, Boushey HA. Rhinovirus-16 colds in Healthy and in asthmatic subjects: similar changes in upper and lower airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(1):100-8.
141. Grünberg K, Smits HH, Timmers MC, de Klerk EPA, Dolhain RJEM, Dick EC, Hiemstra PS, Sterk PJ. Experimental rhinovirus 16 infection: effects on cell differentials and soluble markers in sputum in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(2):609-16.
142. Teran LM, Montefort S, Douglass J, Holgate ST. Neutrophil and eosinophil chemotaxis in asthma. *Quarterly Journal of Medicine*. 1993;86:761-9.
143. Gern JE. Rhinovirus respiratory infections and asthma. *Am J Med*. 2002;112(Suppl 6A):19S-27S.
144. Teran LM, Seminario MC, Shute JK, Papi A, Compton SJ, Low JL, Gleich GJ, Johnston SL. RANTES, macrophage-inhibitory protein 1 α , and the eosinophil product major basic protein are released into upper respiratory secretions during virus-induced asthma exacerbations in children. *J Infect Dis*. 1999;179(3):677-81.
145. Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, Papi A, Leir SH, Fraenkel DJ, Meyer J, Lackie PM, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL. Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis*. 2000;181(6):1875-84.
146. Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, Holgate ST, Davies DE. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med*. 2005;201(6):937-47.
147. Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V, Edwards MR, Wark PA, Bartlett NW, Keadze T, Mallia P, Stanciu LA, Parker HL, Slater L, Lewis-Antes A, Kon OM, Holgate ST, Davies DE, Kotenko SV, Papi A, Johnston SL. Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat Med*. 2006;12(9):1023-6.

148. Moriwaki A, Matsumoto K, Matsunaga Y, Fukuyama S, Matsumoto T, Kan-o K, Noda N, Asai Y, Nakanishi Y, Inoue H. IL-13 suppresses double-stranded RNA-induced IFN-lambda production in lung cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(4):922-7.
149. Thomas BJ, Lindsay M, Dagher H, Freezer NJ, Li D, Ghildyal R, Bardin PG. Transforming growth factor-beta enhances rhinovirus infection by diminishing early innate responses. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(3):339-47.
150. Bedke N, Sammut D, Green B, Kehagia V, Dennison P, Jenkins G, Tatler A, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE. Transforming growth factor-beta promotes rhinovirus replication in bronchial epithelial cells by suppressing the innate immune response. *PLoS One*. 2012;7(9):e44580.
151. Wilson R, Dowling RB, Jackson AD. The biology of bacterial colonization and invasion of the respiratory mucosa. *Eur Resp J*. 1996;9(7):1523-30.
152. Hament JM, Kimpen JL, Fleer A, Wolfs TF. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999;26(3-4):189-95.
153. Evermann JL, Rios C, Seibold MA. Utilization of Air-Liquid Interface Cultures as an In Vitro Model to Assess Primary Airway Epithelial Cell Responses to the Type 2 Cytokine Interleukin-13. In: *Type 2 Immunity: Methods and Protocols*. 1799. *Methods in Molecular Biology*: Springer Science & Business Media; 2018. p. 419-32.
154. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(4):394-418.
155. Hsu S-M, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*. 1981;75(6):816-21.
156. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*. 2003;339(1):62-6.
157. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D447-52.
158. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunological Reviews*. 2004;202:175-90.
159. Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S, Ellwanger A, Sidhu SS, Dao-Pick TP, Pantoja C, Erle DJ, Yamamoto KR, Fahy JV. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(40):15858-63.
160. Gern JE, French DA, Grindle KA, Brockman-Schneider RA, Konno S, Busse WW. Double-stranded RNA induces the synthesis of specific chemokines by bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(6):731-7.

161. Lever AR, Park H, Mulhern TJ, Jackson GR, Comolli JC, Borenstein JT, Hayden PJ, Prantil-Baun R. Comprehensive evaluation of poly(I:C) induced inflammatory response in an airway epithelial model. *Physiol Rep*. 2015;3(4).
162. Rauch I, Muller M, Decker T. The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAKSTAT*. 2013;2(1):e23820.
163. Zhou JH, Wang YN, Chang QY, Ma P, Hu Y, Cao X. Type III interferons in viral infection and antiviral immunity. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(1):173-85.
164. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med*. 1993;177(6):1809-14.
165. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and Related Chemotactic Cytokines—CXC and CC Chemokines. *Advances in Immunology*. 1993;55:97-179.
166. Jackson DJ, Sykes A, Mallia P, Johnston SL. Asthma exacerbations: origin, effect, and prevention. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(6):1165-74.
167. Mertens TCJ, Karmouty-Quintana H, Taube C, Hiemstra PS. Use of airway epithelial cell culture to unravel the pathogenesis and study treatment in obstructive airway diseases. *Pulm Pharmacol Ther*. 2017;45:101-13.
168. Blume C, Davies DE. In vitro and ex vivo models of human asthma. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;84(2):394-400.
169. Pezzulo AA, Starner TD, Scheetz TE, Traver GL, Tilley AE, Harvey BG, Crystal RG, McCray PB, Zabner J. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300(1):L25-31.
170. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH, Hogan BLM. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *PNAS*. 2009;106(31):12771-5.
171. Evans MJ, van Wink LS. Cellular and Molecular Characteristics of Basal Cells in Airway Epithelium. *Experimental Lung Research*. 2009;27(5):401-15.
172. Gray TE, Guzman K, Davis CW, Abdullah LH, Nettesheim P. Mucociliary Differentiation of Serially Passaged Normal Human Tracheobronchial Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;14(1):104-12.
173. Yoon J-H, Moon H-J, Seong J-K, Kim C-H, Lee J-J, Choi JY, Song MS, Kim S-H. Mucociliary differentiation according to time in human nasal epithelial cell culture. *Differentiation*. 2002;70(2-3):77-83.
174. Karp PH, Moninger TO, Weber SP, Nesselhauf TS, Launspach JL, Zabner J, Welsh MJ. An in vitro model of differentiated human airway epithelial. *Methods in Molecular Biology: Epithelial Cell Culture Protocols*. 188: Human Press Inc.; 2002. p. 115-37.

175. Kanoh S, Tanabe T, Rubin BK. IL-13-induced MUC5AC production and goblet cell differentiation is steroid resistant in human airway cells. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(12):1747-56.
176. Chan RW, Yuen KM, Yu WC, Ho CC, Nicholls JM, Peiris JS, Chan MC. Influenza H5N1 and H1N1 virus replication and innate immune responses in bronchial epithelial cells are influenced by the state of differentiation. *PLoS One*. 2010;5(1):e8713.
177. Parker J, Sarlang S, Thavagnanam S, Williamson G, O'Donoghue D, Villenave R, Power U, Shields M, Heaney L, Skibinski G. A 3-D well-differentiated model of pediatric bronchial epithelium demonstrates unstimulated morphological differences between asthmatic and nonasthmatic cells. *Pediatric Research*. 2010;67(1):6.
178. Gras D, Petit A, Charriot J, Knabe L, Alagha K, Gamez AS, Garulli C, Bourdin A, Chanez P, Molinari N, Vachier I. Epithelial ciliated beating cells essential for ex vivo ALI culture growth. *BMC Pulm Med*. 2017;17(1):80.
179. Davis AS, Chertow DS, Moyer JE, Suzich J, Sandouk A, Dorward DW, Logun C, Shelhamer JH, Taubenberger JK. Validation of normal human bronchial epithelial cells as a model for influenza A infections in human distal trachea. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(5):312-28.
180. van Wetering S, Zuyderduyn S, Ninaber DK, van Sterkenburg MA, Rabe KF, Hiemstra PS. Epithelial differentiation is a determinant in the production of eotaxin-2 and -3 by bronchial epithelial cells in response to IL-4 and IL-13. *Mol Immunol*. 2007;44(5):803-11.
181. Lopez-Souza N, Dolganov G, Dubin R, Sachs LA, Sassina L, Sporer H, Yagi S, Schnurr D, Boushey HA, Widdicombe JH. Resistance of differentiated human airway epithelium to infection by rhinovirus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286(2).
182. Rhodin JA. The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *Am Rev Respir Dis*. 1966;93(3):S1-S15.
183. Dvorak A, Tilley AE, Shaykhiev R, Wang R, Crystal RG. Do airway epithelium air-liquid cultures represent the in vivo airway epithelium transcriptome? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(4):465-73.
184. Hackett TL, Singhera GK, Shaheen F, Hayden P, Jackson GR, Hegele RG, van Eeden S, Bai TR, Dorscheid DR, Knight DA. Intrinsic phenotypic differences of asthmatic epithelium and its inflammatory responses to respiratory syncytial virus and air pollution. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(5):1090-100.
185. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. Interleukin-13: Central Mediator of Allergic Asthma. *Science*. 1998;282(5397):2258-61.
186. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiological abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest*. 1999;103:779-88.
187. Barnes PJ. New drugs for asthma. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(10):831-44.

188. Saha SK, Berry MA, Parker D, Siddiqui S, Morgan A, May R, Monk P, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID, Brightling CE. Increased sputum and bronchial biopsy IL-13 expression in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(3):685-91.
189. Atherton H, Jones G, Danahay H. IL-13-induced changes in the goblet cell density of human bronchial epithelial cell cultures: MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase regulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285:L730-L9.
190. Ordóñez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, Hotchkiss JA, Zhang Y, Novikov A, Dolganov G, Fahy JV. Mild and moderate Asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:517-23.
191. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, Alexander SN, Bellinghausen LK, Song AS, Petrova YM, Tuvim MJ, Adachi R, Romo I, Bordt AS, Bowden MG, Sisson JH, Woodruff PG, Thornton DJ, Rousseau K, de la Garza MM, Moghaddam SJ, Karmouty, Quintana H, Blackburn MR, Drouin SM, Davis CW, Terrell KA, Grubb BR, O'Neal WK, Flores SC, Cota-Gomez A, Lozupone CA, Donnelly JM, Watson AM, Hennessy CE, Keith RC, Yang IV, Barthel L, Henson PM, Janssen WJ, Schwartz DA, Boucher RC, Dickey BF, Evans CM. Muc5b is required for airway defence. *Nature*. 2014;505(7483):412-6.
192. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, Koth LL, Arron JR, Fahy JV. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(5):388-95.
193. Jia G, Erickson RW, Choy DF, Mosesova S, Wu LC, Solberg OD, Shikotra A, Carter R, Audusseau S, Hamid Q, Bradding P, Fahy JV, Woodruff PG, Harris JM, Arron JR, Bronchoscopic Exploratory Research Study of Biomarkers in Corticosteroid-refractory Asthma Study Group. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(3):647-54 e10.
194. Hoshino M, Ohtawa J, Akitsu K. Association of airway wall thickness with serum periostin in steroid-naïve asthma. *Allergy Asthma Proc*. 2016;37(3):225-30.
195. Mertens TCJ, van der Does AM, Kistemaker LE, Ninaber DK, Taube C, Hiemstra PS. Cigarette smoke differentially affects IL-13-induced gene expression in human airway epithelial cells. *Physiol Rep*. 2017;5(13).
196. Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Molecular Medicine Today*. 2000;6:20-7.
197. Coleman JM, Naik C, Holguin F, Ray A, Ray P, Trudeau JB, Wenzel SE. Epithelial eotaxin-2 and eotaxin-3 expression: relation to asthma severity, luminal eosinophilia and age at onset. *Thorax*. 2012;67(12):1061-6.
198. Provost V, Langlois A, Chouinard F, Rola-Pleszczynski M, Chakir J, Flamand N, Laviolette M. Leukotriene D4 and interleukin-13 cooperate to increase the release of eotaxin-3 by airway epithelial cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e43544.

199. Nofziger C, Dossena S, Suzuki S, Izuhara K, Paulmichl M. Pendrin Function in Airway Epithelia. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28:571-8.
200. Nakao I, Kanaji S, Ohta S, Matsushita H, Arima K, Yuyama N, Yamaya M, Nakayama K, Kubo H, Watanabe M, Sagara H, Sugiyama K, Tanaka H, Toda S, Hayashi H, Inoue M, Suzuki K, Aizawa H, Okinami S, Nagai H, Hasegawa M, Fukuda T, Green ED, Izuhara K. Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Immunology*. 2008;180(9):6262-9.
201. Shiobara T, Chibana K, Watanabe T, Arai R, Horigane Y, Nakamura Y, Hayashi Y, Shimizu Y, Takemasa A, Ishii Y. Dipeptidyl peptidase-4 is highly expressed in bronchial epithelial cells of untreated asthma and it increases cell proliferation along with fibronectin production in airway constitutive cells. *Respir Res*. 2016;17:28.
202. Ghosh S, Erzurum SC. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(11):1008-16.
203. Fischer A, Folkerts G, Geppetti P, Groneberg DA. Mediators of asthma: nitric oxide. *Pulm Pharmacol Ther*. 2002;15(2):73-81.
204. Guo FH, Comhair SA, Zheng S, Dweik RA, Eissa NT, Thomassen MJ, Calhoun W, Erzurum SC. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J Immunol*. 2000;164(11):5970-80.
205. Kuperman DA, Lewis CC, Woodruff PG, Rodriguez MW, Yang YH, Dolganov GM, Fahy JV, Erle DJ. Dissecting asthma using focused transgenic modeling and functional genomics. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(2):305-11.
206. Kerr SC, Carrington SD, Oscarson S, Gallagher ME, Solon M, Yuan S, Ahn JN, Dougherty RH, Finkbeiner WE, Peters MC, Fahy JV. Intelectin-1 is a prominent protein constituent of pathologic mucus associated with eosinophilic airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(8):1005-7.
207. Yi L, Cheng D, Zhang K, Huo X, Mo Y, Shi H, Di H, Zou Y, Zhang H, Zhao J, Xu J, Erle DJ, Zhen G. Intelectin contributes to allergen-induced IL-25, IL-33, and TSLP expression and type 2 response in asthma and atopic dermatitis. *Mucosal Immunol*. 2017;10(6):1491-503.
208. Zhen G, Park SW, Nguyenvu LT, Rodriguez MW, Barbeau R, Paquet AC, Erle DJ. IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36(2):244-53.
209. Gu N, Kang G, Jin C, Xu Y, Zhang Z, Erle DJ, Zhen G. Intelectin is required for IL-13-induced monocyte chemotactic protein-1 and -3 expression in lung epithelial cells and promotes allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;298(3):L290-6.
210. See H, Wark P. Innate immune response to viral infection of the lungs. *Paediatr Respir Rev*. 2008;9(4):243-50.

211. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31(3):358-64.
212. Lore K, Betts MR, Brenchley JM, Kuruppu J, Khojasteh S, Perfetto S, Roederer M, Seder RA, Koup RA. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol*. 2003;171(8):4320-8.
213. Tabiasco J, Devedre E, Rufer N, Salaun B, Cerottini JC, Speiser D, Romero D. Human effector CD8⁺ T lymphocytes express TLR3 as a functional coreceptor. *J Immunol*. 2006;177(12):8708-13.
214. Edwards MR, Slater L, Johnston SL. Signalling pathways mediating type I interferon gene expression. *Microbes Infect*. 2007;9(11):1245-51.
215. Thompson AJ, Locarnini SA. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(6):435-45.
216. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006;441(7089):101-5.
217. Hewson CA, Jardine A, Edwards MR, Laza-Stanca V, Johnston SL. Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *J Virol*. 2005;79(19):12273-9.
218. Matsumoto M, Seya T. TLR3 interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60(7):8.
219. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*. 2006;7(2):131-7.
220. Message SD, Johnston SL. Host defense function of the airway epithelium in health and disease: clinical background. *J Leukoc Biol*. 2004;75(1):5-17.
221. Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1281-90.
222. Melkamu T, Squillace D, Kita H, O'Grady SM. Regulation of TLR2 expression and function in human airway epithelial cells. *J Membr Biol*. 2009;229(2):101-13.
223. Hayden F, Fritz RS, Lobo MC, Alvord WG, Strober W, Straus SE. Local and Systemic Cytokine Response during Experimental Human Influenza A Virus Infection. *J Clin Invest*. 1998;101(3):643-9.
224. Lopez-Souza N, Favoreto S, Wong H, Ward T, Yagi S, Schnurr D, Finkbeiner WE, Dolganov GM, Widdicombe JH, Boushey HA, Avila PC. In vitro susceptibility to rhinovirus infection is greater for bronchial than for nasal airway epithelial cells in human subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(6):1384-90 e2.

225. Taima K, Imaizumi T, Yamashita K, Ishikawa A, Fujita T, Yoshida H, Takanashi S, Okumara K, Satoh K. Expression of IP-10/CXCL10 is upregulated by double-stranded RNA in BEAS-2B bronchial epithelial cells. *Respiration*. 2006;73(3):360-4.
226. Ioannidis I, McNally B, Willette M, Peebles ME, Chaussabel D, Durbin JE, Ramilo O, Mejias A, Flano E. Plasticity and virus specificity of the airway epithelial cell immune response during respiratory virus infection. *J Virol*. 2012;86(10):5422-36.
227. Becker S, Reed W, Henderson FW, Noah TL. RSV infection of human airway epithelial cells causes production of the beta-chemokines RANTES. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 1997;272(3):L512-L20.
228. Saito T, Deskin RW, Casola A, Häeberle H, Olszewska B, Ernst PB, Alam R, Ogra PL, Garofalo R. Respiratory syncytial virus induces selective production of the chemokine RANTES by upper airway epithelial cells. *J Infect Dis*. 1997;175(3):497-504.
229. Piper SC, Ferguson J, Kay L, Parker LC, Sabroe I, Sleeman MA, Briend E, Finch DK. The role of interleukin-1 and interleukin-18 in pro-inflammatory and anti-viral responses to rhinovirus in primary bronchial epithelial cells. *PLoS One*. 2013;8(5):e63365.
230. Ank N, Paludan SR. Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity. *Biofactors*. 2009;35(1):82-7.
231. Ank N, West H, Paludan SR. IFN- λ : Novel antiviral cytokines. *J Interferon Cytokine Res*. 2006;26:373-9.
232. Bochkov YA, Hanson KM, Keles S, Brockman-Schneider RA, Jarjour NN, Gern JE. Rhinovirus-induced modulation of gene expression in bronchial epithelial cells from subjects with asthma. *Mucosal Immunol*. 2010;3(1):69-80.
233. Proud D, Turner RB, Winther B, Wiehler S, Tiesman JP, Reichling TD, Juhlin KD, Fulmer AW, Ho BY, Walanski AA, Poore CL, Mizoguchi H, Jump L, Moore ML, Zukowski CK, Clymer JW. Gene expression profiles during in vivo human rhinovirus infection: insights into the host response. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(9):962-8.
234. Chen Y, Hamati E, Lee PK, Lee WM, Wachi S, Schnurr D, Yagi S, Dolganov G, Boushey H, Avila P, Wu R. Rhinovirus induces airway epithelial gene expression through double-stranded RNA and IFN-dependent pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34(2):192-203.
235. Castelli J, Wood KA, Youle RJ. The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomed Pharmacother*. 1998;52(9):386-90.
236. Fensterl V, Sen GC. The ISG56/IFIT1 gene family. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(1):71-8.
237. Diamond MS, Farzan M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(1):46-57.
238. Seo JY, Yaneva R, Cresswell P. Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that regulates virus replication. *Cell Host Microbe*. 2011;10(6):534-9.

239. Sajjan U, Wang Q, Zhao Y, Gruenert DC, Hershenon MB. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(12):1271-81.
240. Yeo NK, Jang YJ. Rhinovirus infection-induced alteration of tight junction and adherens junction components in human nasal epithelial cells. *Laryngoscope*. 2010;120(2):346-52.
241. Rezaee F, Meednu N, Emo JA, Saatian B, Chapman TJ, Naydenov NG, De Benedetto A, Beck LA, Ivanov AI, Georas SN. Polyinosinic:polycytidylic acid induces protein kinase D-dependent disassembly of apical junctions and barrier dysfunction in airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(6):1216-24 e11.
242. Comstock AT, Ganesan S, Chatteraj A, Faris AN, Margolis BL, Hershenon MB, Sajjan US. Rhinovirus-induced barrier dysfunction in polarized airway epithelial cells is mediated by NADPH oxidase 1. *J Virol*. 2011;85(13):6795-808.
243. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*. 1992;101(4):916-21.
244. Jakiela B, Gielicz A, Plutecka H, Hubalewska-Mazgaj M, Mastalerz L, Bochenek G, Soja J, Januszek R, Aab A, Musial J, Akdis M, Akdis CA, Sanak M. Th2-type cytokine-induced mucus metaplasia decreases susceptibility of human bronchial epithelium to rhinovirus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;51(2):229-41.
245. Larose MC, Chakir J, Archambault AS, Joubert P, Provost V, Laviolette M, Flamand N. Correlation between CCL26 production by human bronchial epithelial cells and airway eosinophils: Involvement in patients with severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(4):904-13.
246. Li L, Xia Y, Nguyen A, Hon Lai Y, Feng L, Mosmann TR, Lo D. Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. *J Immunol*. 1999;162:2477-87.
247. Roberts N, Al Mubarak R, Francisco D, Kraft M, Chu HW. Comparison of paired human nasal and bronchial airway epithelial cell responses to rhinovirus infection and IL-13 treatment. *Clin Transl Med*. 2018;7(1):13.
248. Nakagome K, Nagata M. Involvement and possible role of eosinophils in asthma exacerbation. *Front Immunol*. 2018;9:2220.
249. Message SD, Laza-Stanca V, Mallia P, Parker HL, Zhu J, Keadze T, Contoli M, Sanderson G, Kon OM, Papi A, Jeffery PK, Stanciu LA, Johnston SL. Rhinovirus-induced lower respiratory illness is increased in asthma and related to virus load and Th1/2 cytokine and IL-10 production. *PNAS*. 2008;105(36):13562-7.

250. Ghebre MA, Pang PH, Diver S, Desai D, Bafadhel M, Haldar K, Kebabdz T, Cohen S, Newbold P, Rapley L, Woods J, Rugman P, Pavord ID, Johnston SL, Barer M, May RD, Brightling CE. Biological exacerbation clusters demonstrate asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap with distinct mediator and microbiome profiles. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(6):2027-36 e12.
251. Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y. Serum eosinophil cationic protein and 27 cytokines/chemokines in acute exacerbation of childhood asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152(Suppl 1):62-6.
252. Lunding LP, Webering S, Vock C, Behrends J, Wagner C, Holscher C, Fehrenbach H, Wegmann M. Poly(inosinic-cytidylic) acid-triggered exacerbation of experimental asthma depends on IL-17A produced by NK cells. *J Immunol*. 2015;194(12):5615-25.
253. Lai ST, Hung CH, Hua YM, Hsu SH, Jong YJ, Suen JL. T-helper 1-related chemokines in the exacerbation of childhood asthma. *Pediatr Int*. 2008;50(1):99-102.
254. Cakebread JA, Haitchi HM, Xu Y, Holgate ST, Roberts G, Davies DE. Rhinovirus-16 induced release of IP-10 and IL-8 is augmented by Th2 cytokines in a pediatric bronchial epithelial cell model. *PLoS One*. 2014;9(4):e94010.
255. Johnston SL. Innate immunity in the pathogenesis of virus-induced asthma exacerbations. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(3):267-70.
256. Edwards MR, Regamey N, Vareille M, Kieninger E, Gupta A, Shoemark A, Saglani S, Sykes A, Macintyre J, Davies J, Bossley C, Bush A, Johnstons SL. Impaired innate interferon induction in severe therapy resistant atopic asthmatic children. *Mucosal Immunol*. 2013;6(4):797-806.
257. Sykes A, Macintyre J, Edwards MR, Del Rosario A, Haas J, Gielen V, Kon OM, McHale M, Johnston SL. Rhinovirus-induced interferon production is not deficient in well controlled asthma. *Thorax*. 2014;69(3):240-6.
258. Moskwa S, Piotrowski W, Marczak J, Pawelczyk M, Lewandowska-Polak A, Jarzebska M, Brauncajs M, Globinska A, Gorski P, Papadopoulos NG, Edwards MR, Johnston SL, Kowalski ML. Innate immune response to viral infections in primary bronchial epithelial cells is modified by the atopic status of asthmatic patients. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2018;10(2):144-54.
259. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma - Leitlinienreport, 2. Auflage. Version 2. 2012, zuletzt geändert: August 2013.
260. Loureiro CC, Duarte IF, Gomes J, Carrola J, Barros AS, Gil AM, Bousquet J, Bom AT, Rocha SM. Urinary metabolomic changes as a predictive biomarker of asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(1):261-3 e1-5.

261. Nakamoto K, Watanabe M, Sada M, Inui T, Nakamura M, Honda K, Wada H, Matsuzaki H, Horie M, Noguchi S, Yamauchi Y, Koyama H, Kogane T, Kohyama T, Takizawa H. Serum reactive oxygen metabolite levels predict severe exacerbations of asthma. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164948.
262. Wojsyk-Banaszak I, Mikos M, Szczepankiewicz A, Wielebska A, Sobkowiak P, Kaminska A, Brevorowicz A. Evaluation of exhaled breath temperature (EBT) as a marker and predictor of asthma exacerbation in children and adolescents. *J Asthma*. 2017;54(7):699-705.
263. Fricker M, Gibson PG, Powell H, Simpson JL, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, Jenkins C, Peters MJ, Marks GB, Baraket M, Baines KJ. A sputum 6-gene signature predicts future exacerbations of poorly controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2019.
264. Helbig KJ, Beard MR. The role of viperin in the innate antiviral response. *J Mol Biol*. 2014;426(6):1210-9.
265. Barral PM, Sarkar D, Su ZZ, Barber GN, DeSalle R, Racaniello VR, Fisher PB. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity. *Pharmacol Ther*. 2009;124(2):219-34.
266. Zaheer RS, Wiehler S, Hudy MH, Traves SL, Pelikan JB, Leigh R, Proud D. Human rhinovirus-induced ISG15 selectively modulates epithelial antiviral immunity. *Mucosal Immunol*. 2014;7(5):1127-38.
267. Wark PA, Bucchieri F, Johnston SL, Gibson PG, Hamilton L, Mimica J, Zummo G, Holgate ST, Attia J, Thakkestian A, Davies DE. IFN-gamma-induced protein 10 is a novel biomarker of rhinovirus-induced asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(3):586-93.
268. Chan CK, Kuo ML, Yeh KW, Ou LS, Chen LC, Yao TC, Huang JL. Sequential evaluation of serum monocyte chemotactic protein 1 among asymptomatic state and acute exacerbation and remission of asthma in children. *J Asthma*. 2009;46(3):225-8.
269. Griggs TF, Bochkov YA, Basnet S, Pasic TR, Brockman-Schneider RA, Palmenberg AC, Gern JE. Rhinovirus C targets ciliated airway epithelial cells. *Respir Res*. 2017;18(1):84.
270. Surendran T, Parker JC, McBrien ME, Skibinski G, Heaney LG, Shields MD. Effects of IL-13 on mucociliary differentiation of pediatric asthmatic bronchial epithelial cells. *Pediatric Research*. 2011;69(2):95-100.
271. Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao X-Q, Enomoto T, Dake Y, Shimazu, S-I, Yamashita, T, Sugawara N, Brodeur S, Geha R, Puri RK, Sayegh MH, Adra CN, Hamasaki N, Hopkin JM, Shirakawa T, Izuhara K. Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(6):980-7.
272. Hoffjan S, Ober C. Present status on the genetic studies of asthma. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(6):709-17.

273. Xu C-J, Söderhäll C, Bustamante M, Baiz N, Gruziova O, Gehring U, Mason D, Chatzi L, Basterrechea M, Llop S, Torrent M, Forastiere F, Fantini MP, Carlson KCL, Haahtela T, Morin A, Kerkhof M, Merid SK, van Rijkom B, Janipersadsing SA, Bonder MJ, Ballereau S, Vermeulen CJ, Aguirre, Gamboa R, de Jongste JC, Smit HA, Kumar A, Pershagen G, Guerra S, Garcia-Aymerich J, Greco D, Reinius L, MaEachan RRC, Azad R, Hovland V, Mowinckel P, Alenius H, Fyhrquist N, Lemonnier N, Pellet J, Auffray C, van der Vlies P, van Diemen CC, Li Y, Wijmenga C, Netea MG, Moffatt MF, Cookson WOCM, Anto JM, Bousquet J, Laatikainen T, Laprise C, Calsen K-H, Gori D, Porta D, Iniguez C, Biobao JR, Kogevinas M, Wright J, Brunekreff B, Kere J, Nawijn MC, Annesi-Maesano I, Sunyer J, Melén E, Koppelman GH. DNA methylation in childhood asthma: an epigenome-wide meta-analysis. *Lancet Respir Med*. 2018;6(5):379-88.
274. Reese SE, Xu CJ, den Dekker HT, Lee MK, Sikdar S, Ruiz-Arenas C, Merid SK, Rezwan FI., Page CM, Ullema V, Melton PE, Oh SS, Yang IV, Burrows K, Soderhall C, Jima DD, Gao L, Arathimos R, Kupers LK, Wielscher M, Rzehak P, Lahti J, Laprise C, Madore AM, Ward J, Bennett BD, Wang T, Bell DA, Bios Consortium, Vonk JM, Haberg SE, Zhao S, Karlsson R, Hollams E, Hu D, Richards AJ, Bergstrom A, Sharp GC, Felix JF, Bustamante M, Gruziova O, Maguire RL, Gilliland F, Baiz N, Nohr EA, Corpeleijn E, Sebert S, Karmaus W, Grote V, Kajantie E, Magnus MC, Ortqvist AK, Eng C, Liu AH, Kull I, Jaddoe VWV, Sunyer J, Kere J, Hoyo C, Annesi-Maesano I, Arshad SH, Koletzko B, Brunekreef B, Binder EB, Raikkonen K, Reischl E, Holloway JW, Jarvelin MR, Snieder H, Kazmi N, Breton CV, Murphy SK, Pershagen G, Anto JM, Relton CL, Schwartz DA, Burchard EG, Huang RC, Nystad W, Almqvist C, Henderson AJ, Melen E, Duijts L, Koppelman GH, London SJ. Epigenome-wide meta-analysis of DNA methylation and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;143(6):2062-74.
275. Lim E, Rothenberg ME. Demethylation of the human eotaxin-3 gene promoter leads to the elevated expression of eotaxin-3. *J Immunol*. 2014;192(1):466-74.
276. Kogan V, Millstein J, London SJ, Ober C, White SR, Naureckas ET, Gauderman WJ, Jackson DJ, Barraza-Villarreal A, Romieu I, Raby BA, Breton CV. Genetic-epigenetic interactions in asthma revealed by a genome-wide gene-centric search. *Hum Hered*. 2018;83(3):130-52.

Anhang

I Expression von *Pattern Recognition Receptors*

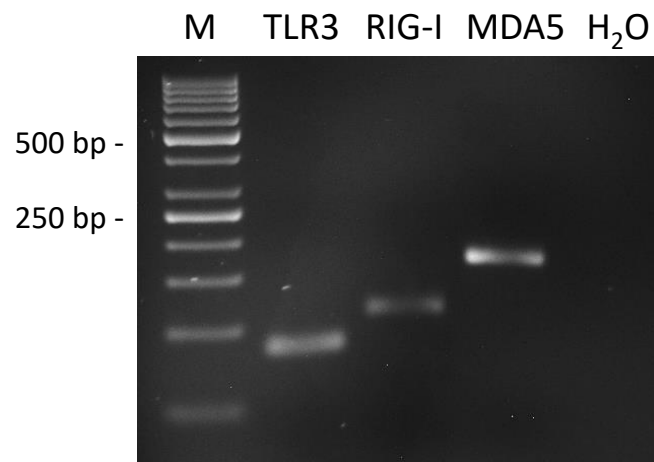


Abb. A.1: *In vitro* Expression der *Pattern Recognition Receptors* TLR3, RIG-I und MDA5 in ALI-Epithelien von NHBECs. Nach 28 Tagen Differenzierung unter ALI-Bedingungen wurde die mRNA isoliert, aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine qRT-PCR mit Primern für die Gene TLR3, RIG-I (Primer: DDX58) sowie MDA5 (Primer: IFIH1) durchgeführt und die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen.

II Heat Maps der Genexpressionsmuster

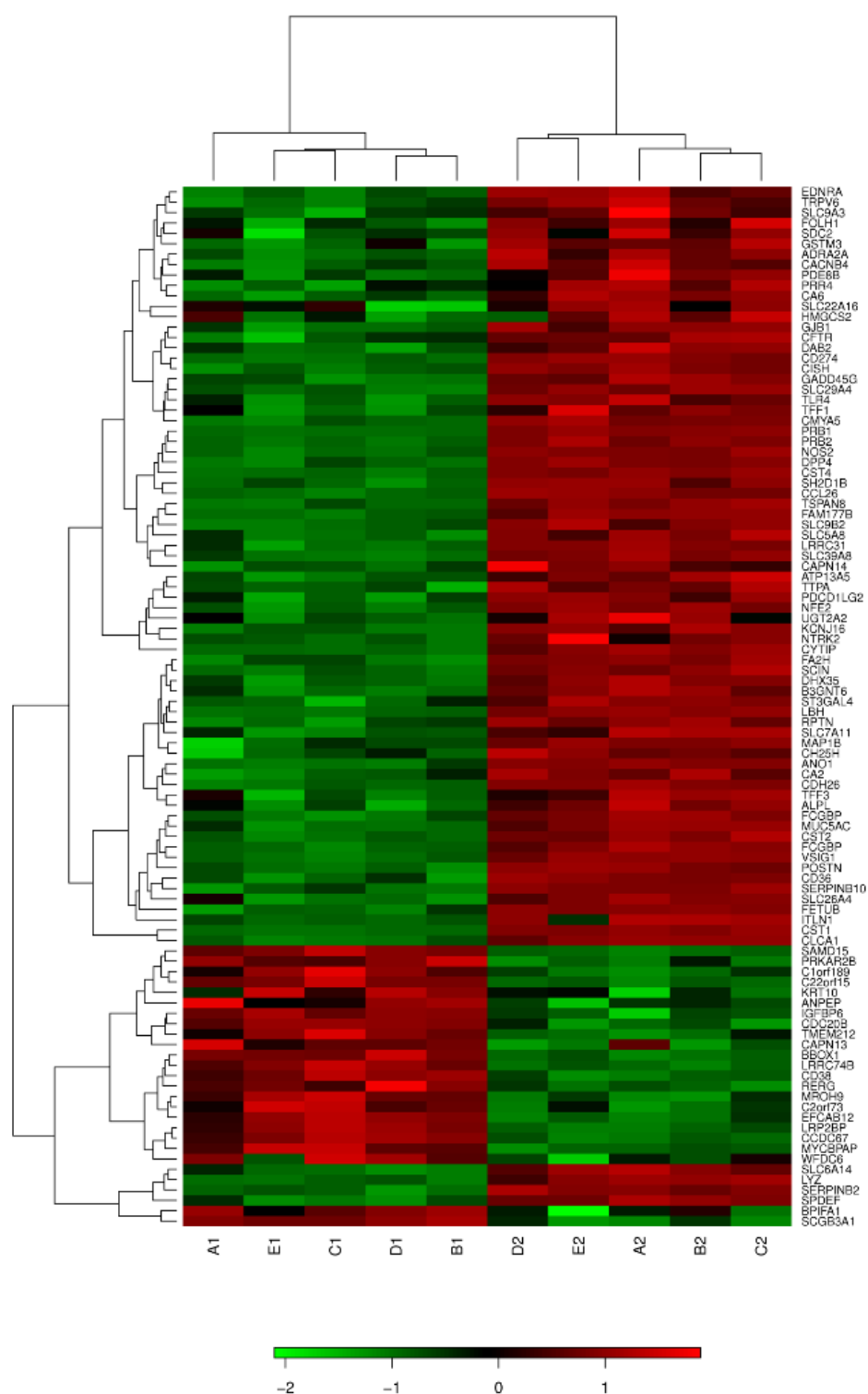


Abb. A.2: Heat Map von unstimulierten und rhIL-13-behandelten ALI-Zellkulturen von NHBEs. A1 bis E1 stellen die unstimulierten ALI-Zellkulturproben dar. A2 bis E2 sind die ALI-Zellkulturen der fünf gesunden Spender, welche von Tag 21 bis Tag 28 mit 5 ng/ml rhIL-13 stimuliert wurden. Es sind die 100 Gene mit dem größten *Fold Change* dargestellt. Hohe Expressionsintensitäten sind in rot dargestellt, geringe Expressionsintensitäten in grün und schwarz zeigt mittlere Intensitäten an.

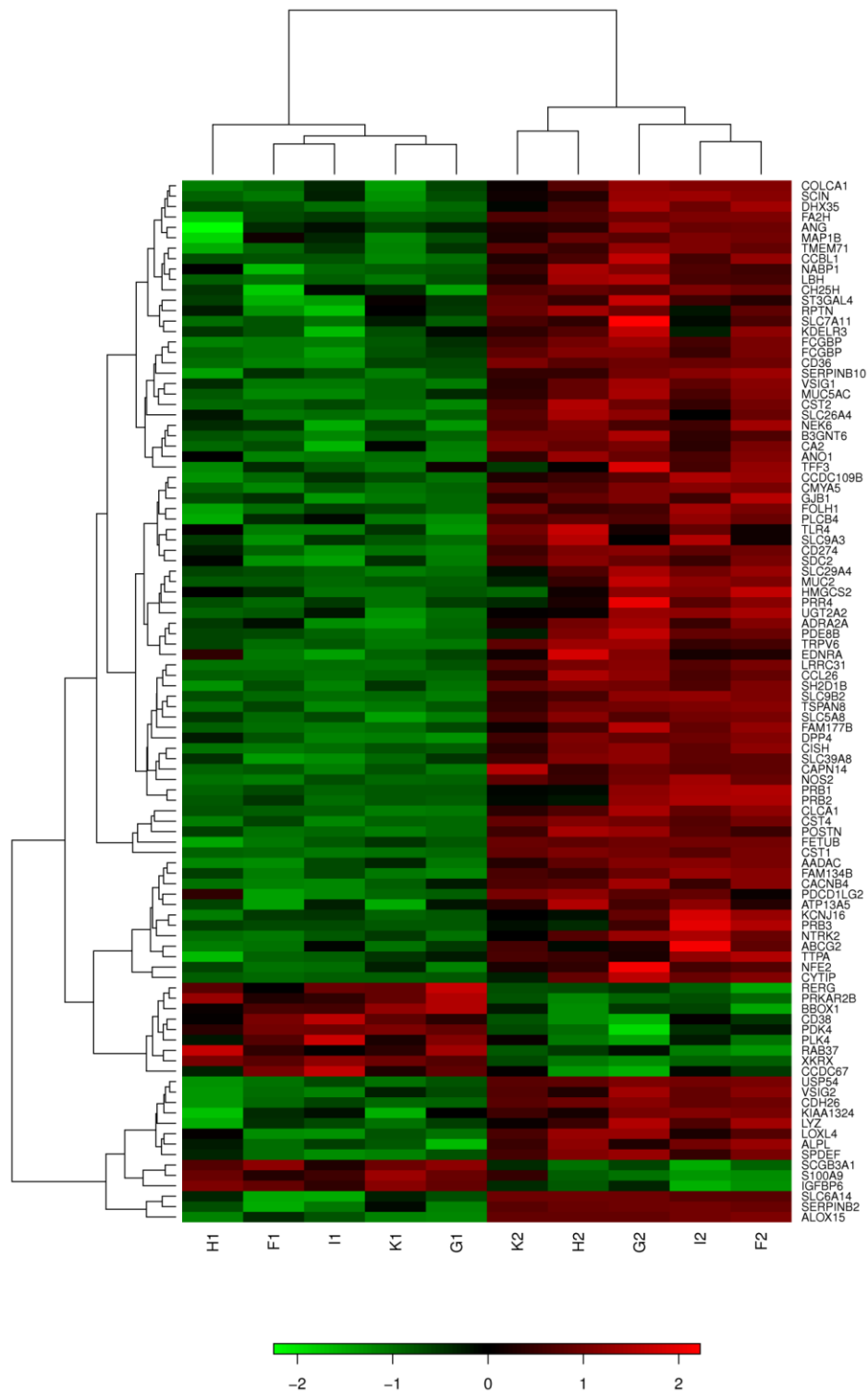


Abb. A.3: Heat Map von unstimulierten und rhIL-13-behandelten ALI-Zellkulturen von DHBEcs. F1 bis K1 stellen die unstimulierten ALI-Zellkulturproben dar. F2 bis K2 sind die ALI-Zellkulturen der fünf gesunden Spender, welche von Tag 21 bis Tag 28 mit 5 ng/ml rhIL-13 stimuliert wurden. Es sind die 100 Gene mit dem größten *Fold Change* dargestellt. Hohe Expressionsintensitäten sind in rot dargestellt, geringe Expressionsintensitäten in grün und schwarz zeigt mittlere Intensitäten an.

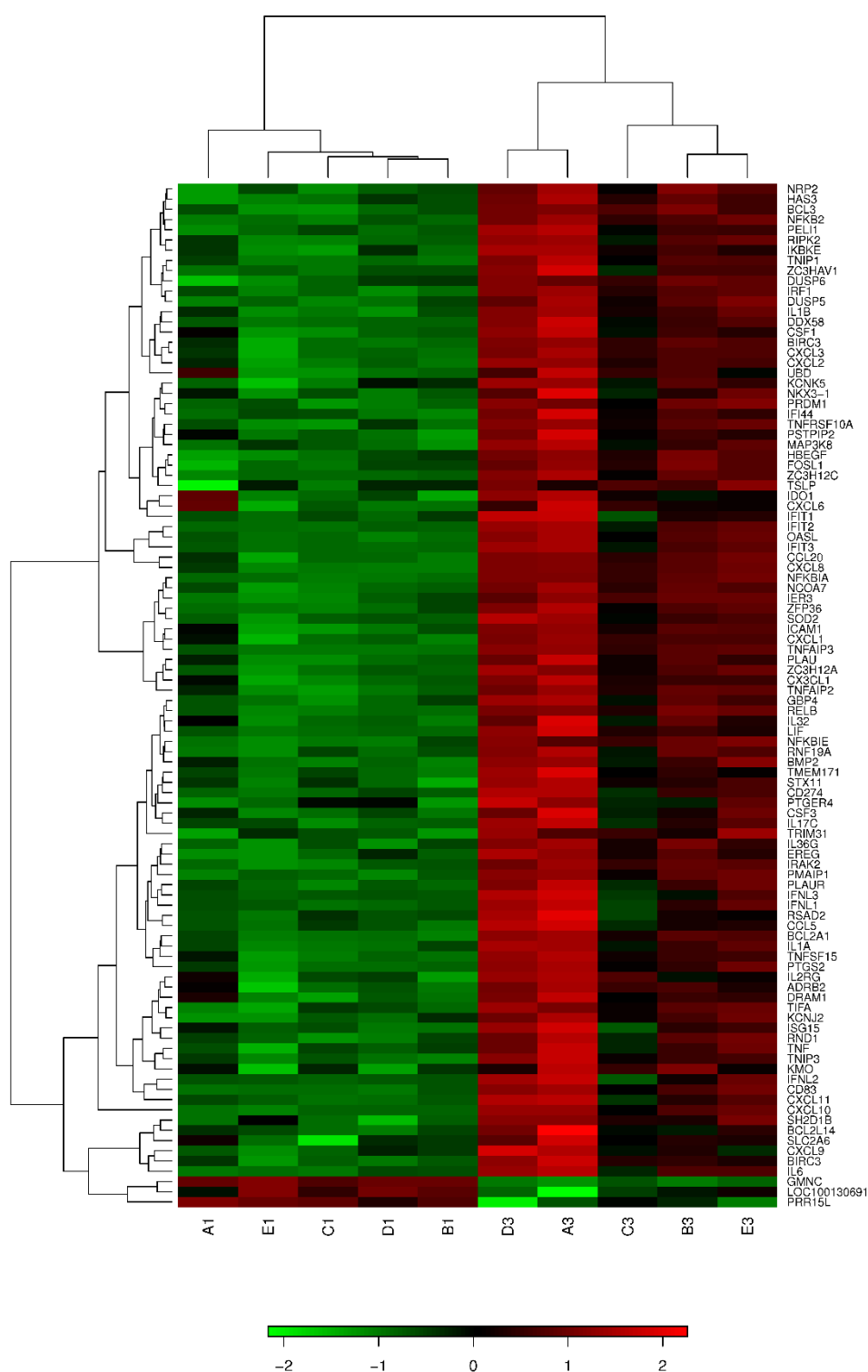


Abb. A.4: Heat Map von unstimulierten und Poly(I:C)-behandelten ALI-Zellkulturen von NHBEs. A1 bis E1 stellen die unstimulierten ALI-Zellkulturproben dar. A2 bis E2 sind die ALI-Zellkulturen der fünf gesunden Spender, welche an Tag 28 für 3h mit 5 µg/ml Poly(I:C) stimuliert wurden. Es sind die 100 Gene mit dem größten *Fold Change* dargestellt. Hohe Expressionsintensitäten sind in rot dargestellt, geringe Expressionsintensitäten in grün und schwarz zeigt mittlere Intensitäten an.

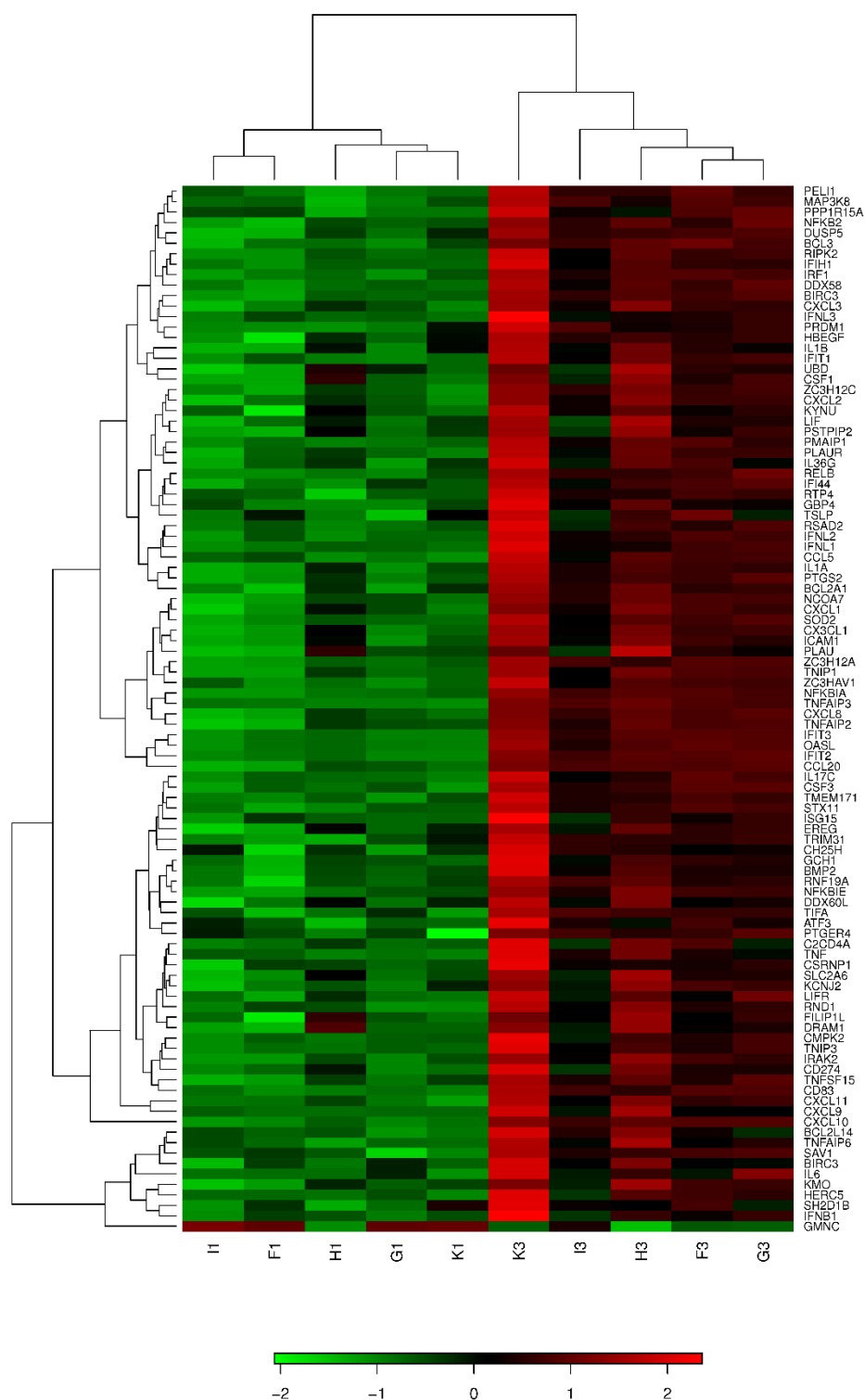


Abb. A.5: Heat Map von unstimulierten und Poly(I:C)-behandelten ALI-Zellkulturen von DHBECS. F1 bis K1 stellen die unstimulierten ALI-Zellkulturproben dar. F2 bis K2 sind die ALI-Zellkulturen der fünf gesunden Spender, welche an Tag 28 für 3h mit 5 µg/ml Poly(I:C) stimuliert wurden. Es sind die 100 Gene mit dem größten *Fold Change* dargestellt. Hohe Expressionsintensitäten sind in rot dargestellt, geringe Expressionsintensitäten in grün und schwarz zeigt mittlere Intensitäten an.

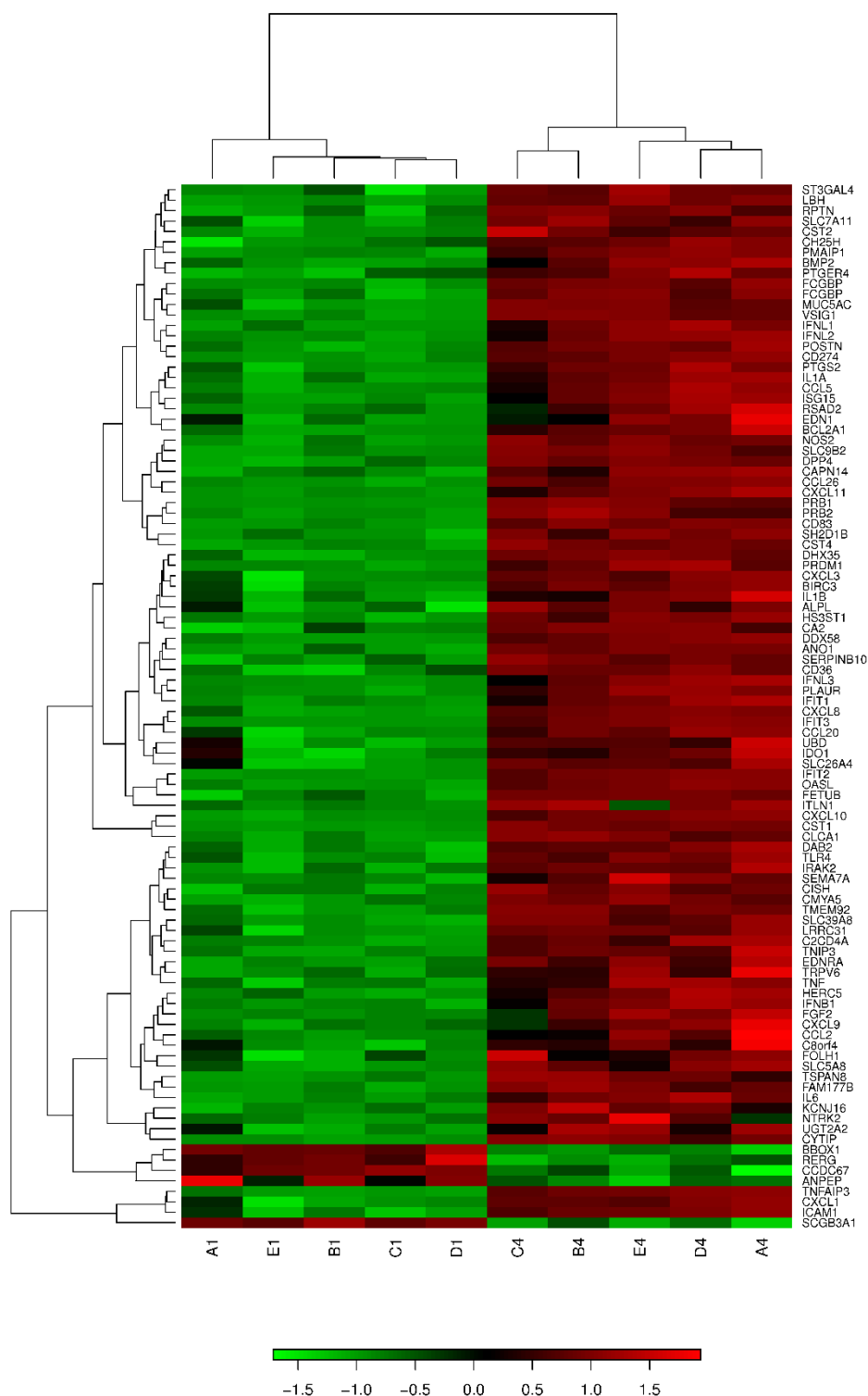


Abb. A.6: Heat Map von unstimulierten und rhIL-13- und Poly(I:C)-kostimulierten ALI-Zellkulturen von NHBEs. A1 bis E1 stellen die unstimulierten ALI-Zellkulturproben dar. A2 bis E2 sind die ALI-Zellkulturen der fünf gesunden Spender, welche von Tag 21 bis Tag 28 mit 5 ng/ml rhIL-13- behandelt wurden und an Tag 28 für 3h zusätzlich 5 µg/ml Poly(I:C) appliziert wurde. Es sind die 100 Gene mit dem größten *Fold Change* dargestellt. Hohe Expressionsintensitäten sind in rot dargestellt, geringe Expressionsintensitäten in grün und schwarz zeigt mittlere Intensitäten an.

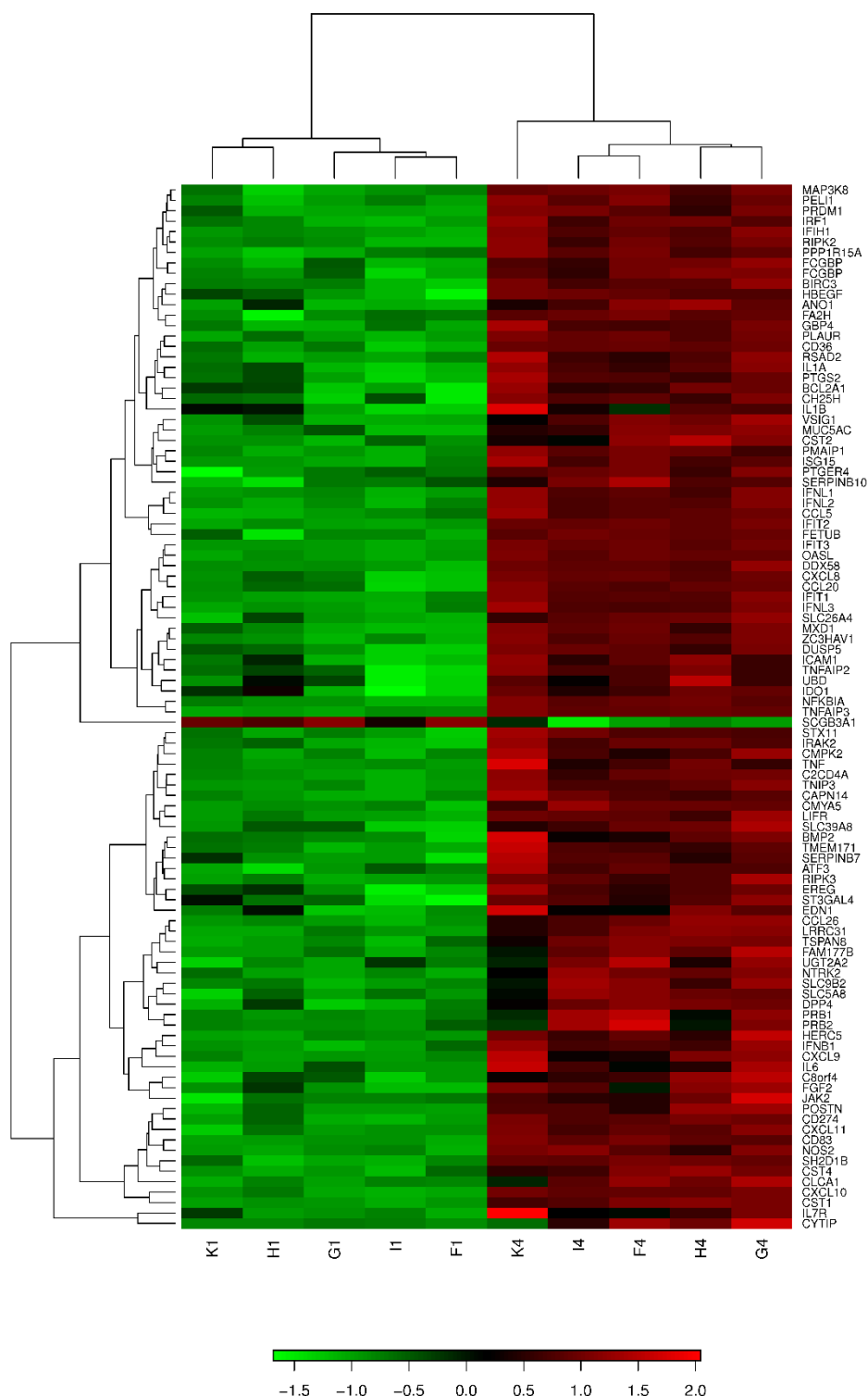


Abb. A.7: Heat Map von unstimulierten und rhIL-13- und Poly(I:C)-kostimulierten ALI-Zellkulturen von DHBECS. F1 bis K1 stellen die unstimulierten ALI-Zellkulturproben dar. F2 bis K2 sind die ALI-Zellkulturen der fünf gesunden Spender, welche von Tag 21 bis Tag 28 mit 5 ng/ml rhIL-13- behandelt wurden und an Tag 28 für 3h zusätzlich 5 µg/ml Poly(I:C) appliziert wurde. Es sind die 100 Gene mit dem größten *Fold Change* dargestellt. Hohe Expressionsintensitäten sind in rot dargestellt, geringe Expressionsintensitäten in grün und schwarz zeigt mittlere Intensitäten an.

III Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ADCY4	<i>Adenylate Cyclase 4</i>
AHR	Atemwegshyperreagibilität
ALI	<i>Air-liquid Interface</i>
ALPL	<i>Alkaline Phosphatase, Liver/Bone/Kidney</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APOBEC3A	<i>Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 3A</i>
Arg	Arginin
ATF3	<i>Activating Transcription Factor 3</i>
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BCL2A1	<i>BCL2 Related Protein A1</i>
BEGM	<i>Bronchial Epithelial Cell Growth Medium</i>
Bg	Blutgefäße
BIND	<i>Biomolecular Interaction Network Database</i>
BIRC3	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 3</i>
Bm	Basalmembran
bp	Basenpaare
C2CD4A	<i>C2 Calcium Dependent Domain Containing 4A</i>
C8orf4 (TCIM)	<i>Transcriptional and Immune Response Regulator</i>
CAPN14	<i>Calpain 14</i>
CC-10	<i>Clara Cells 10 kDa Secretory Protein</i>
CCL	C-C-Motiv Chemokin Ligand
CCR	C-C-Motiv Chemokin Rezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>Complementary DNA</i>)
CH25H	<i>Cholesterol 25-Hydroxylase</i>
CK-5	Zytokeratin 5
CLC	<i>Charcot-Leyden Crystal Galectin</i>
CLCA1	<i>Chloride Channel, Calcium Activated, Family Member 1</i>
CPA3	<i>Carboxypeptidase 3</i>
CF1	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>
CSRNP1	<i>Cysteine and Serine Rich Nuclear Protein 1</i>
CST	<i>Cystatin</i>
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
CXCR	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor</i>
CYTIP	<i>Cytohesin 1 Interacting Protein</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDX	DExD/H-Box Helikase

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHBECS	asthmatische humane Bronchialepithelzellen (<i>diseased human bronchial epithelial cells</i>)
DIP	<i>Database of Interacting Proteins</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribunucleic Acid</i>)
DNASE1L3	<i>Deoxyribunuclease 1-like 3</i>
DPP4	<i>Dipeptidyl Peptidase 4</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA (<i>Doublestranded RNA</i>)
EBT	<i>Exhaled Breath Temperature</i>
ECP	eosinophiles kationisches Protein
EDN1	<i>Endothelin 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Ep	Epithel
EPO	eosinophile Peroxidase
EPSTI1	<i>Epithelial Stromal Interaction 1</i>
FAM	<i>Family With Sequence Similarity Member</i>
FCGBP	<i>Fc Fragment of IgG Binding Protein</i>
FCS	fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FETUB	<i>Fetuin B</i>
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
for	<i>forward</i>
FoxJ1	<i>Forkhead Box J1</i>
GC	Becherzellen (<i>Goblet Cells</i>)
Gln	Glutamin
gM	glatte Muskulatur
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GO	<i>Gene Ontology</i>
GRID	<i>General Repository for Interaction Datasets</i>
HBSS	Salzlösung nach Hanks
HBECs	humane Bronchialepithelzellen
HCl	Salzsäure
HDAC9	<i>Histone Deacetylase 9</i>
HERC5	<i>HECT and RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 5</i>
HPRD	<i>Human Protein Reference Database</i>
hRV	humanes Rhinovirus
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IDO1	<i>Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1</i>
IFIH1	<i>Interferon Induced With Helicase C Domain 1</i>
IFIT	<i>Interferon Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats</i>

IFN	Interferon
IgE	Immunoglobulin E
IL	Interleukin
IL-7R	Interleukin-7 Rezeptor
ILC2	Typ-2 innate lymphoide Zellen
IP-10	Interferon- γ -induziertes Protein
IRAK2	<i>Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 2</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
ISG	<i>Interferon-Stimulated Gene</i>
ITLN1	Intelectin-1
JAK	<i>Janus Kinase</i>
Kap	Kapitel
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LIFR	<i>LIF Receptor Subunit Alpha</i>
LIPG	<i>Lipase G, Endothelial Type</i>
LP	<i>Length per Point</i>
LRRC31	<i>Leucin Rich Repeat Containing 31</i>
MBP	<i>Major Basic Protein</i>
MCP	<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated Gene 5</i>
MHC II	Hauptkompatibilitätskomplex II (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MINT	<i>Molecular INTERaction Database</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MXD1	<i>MAD Dimerization Protein 1</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
newCAST	<i>New Computer Assisted Stereology Toolbox</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells</i>
NHBECS	lungen-gesunde humane Bronchialepithelzellen, (<i>normal human bronchial epithelial cells</i>)
NOCT	<i>Nocturnin</i>
NOD	<i>Nucleotide Oligomerization Domain</i>
NOS2	Stickstoffmonoxid-Synthase 2
OASL	<i>2'-5'-Oligoadenylate Synthase like</i>
OD	optische Dichte
OX40	TNFRSF4 genannt, <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 4</i>
OX40L	OX40-Ligand
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PAS	Perjodsäure-Schiff
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pen	Penicillin
PID	<i>Pathway Interaction Database</i>

PMAIP	<i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein</i>
PLAUR	<i>Plasminogen Activator, Urokinase Receptor</i>
Poly(I:C)	Polyinosin:Polycytidyläure
POSTN	Periostin
PPP1R15A	<i>Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 15A</i>
PRB	<i>Proline Rich Protein BstNI subfamily</i>
PRDM1	<i>PR/SET Domain 1</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
PTGER4	<i>Prostaglandin E Receptor 4</i>
RAET1L	<i>Retinoic Acid Early Transcript 1L</i>
RANTES	<i>Regulated On Activation, Normal T Cell Expressed And Secreted</i>
rev	<i>revers</i>
rhIL-13	rekombinantes humanes Interleukin-13
RHOB	<i>Ras Homolog Family Member B</i>
RIG-I	<i>Retinoic Acid Inducible-Gene I</i>
RIPK	<i>Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase</i>
RMA	<i>Robust Multichip Average</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RPL32	Ribosomales Protein L32
RSAD1	<i>Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 1</i>
RSV	respiratorisches syncytiales Virus
RT	Raumtemperatur
SEMA7A	<i>Semaphorin 7A (John Milton Hagen Blood Group)</i>
SD	Standardabweichung
SerpinB2	<i>Serine Family B Member 2</i>
SerpinB10	<i>Serpin Family B Member 10</i>
SH2D1B	<i>SH2 Domain Containing 1B</i>
SLC	<i>Solute Carrier Family</i>
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SPDEF	<i>SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor</i>
ssRNA	einzelsträngige RNA (<i>Singlestranded RNA</i>)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
Strept	Streptomycin
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
SURS	<i>Systematic Uniform Random Sampling</i>
Tab	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th ₁	Typ-1 T-Helferzelle
Th ₂	Typ-2 T-Helferzelle

TJP	<i>Tight Junction Protein</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TMEM	<i>Transmembrane Protein</i>
TMPRSS2	<i>Transmembrane Serine Protease 2</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNFAIP	<i>TNF Alpha Induced Protein</i>
TNFSF	<i>TNF Superfamily Member</i>
TNIP3	<i>TNFAIP3 Interacting Protein 3</i>
TNS	Trypsin Neutralisationslösung (<i>Trypsin Neutralization Solution</i>)
TRIM	<i>Tripartite Motif Containing</i>
TRIS	Tris(hydroxymethylaminomethan)
T _{reg} 1	Typ-1 regulatorische Zelle
TSLP	<i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
TSPAN	<i>Tetraspanin</i>
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VSIG1	<i>V-Set And Immunoglobulin Domain Containing 1</i>
WARS	<i>Tryptophanyl-tRNA Synthetase</i>

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass diese Abhandlung – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer - nach Inhalt und Form eine eigenständige und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasste Arbeit ist.

Überdies versichere ich, dass weder die gesamte Arbeit noch zum Teil bereits an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht wurde.

Ich erkläre, dass diese Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Außerdem versichere ich, dass mir kein akademischer Grad entzogen wurde.

Kiel, den _____
(Datum)

(Johanna Christine Ehlers)

Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Prof. Dr. Thomas Roeder für die Übernahme des Erstgutachters bedanken.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Heinz Fehrenbach bedanken. Durch ihn wurde mir die Möglichkeit gegeben meine Promotion am FZB in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Die gesamte Zeit stand er mir zur Seite und hat mir bei jedem Problem weitergeholfen. Weiterhin wurde mir dank ihm die Möglichkeit gegeben an vielen nationalen und internationalen Konferenzen teilzunehmen, was nicht selbstverständlich ist.

Großer Dank gilt auch Dr. Christina Vock für die gesamte Betreuung, unzählige Korrekturen von Abstracts und die Unterstützung während meiner gesamten Zeit als Doktorandin. Die Fahrgemeinschaft war immer unterhaltsam und lustig, sodass die täglichen Fahrten nach Borstel und zurück wie im Flug vergingen.

Die vielen Stunden im Labor wurden weiterhin durch Franziska Beyersdorf, Juliane Artelt, Linda Lang und Patricia Prilla zu einer sehr schönen Zeit. Sie haben mir immer mit ihrem Know-How weitergeholfen und mich unterstützt, wo sie nur konnten. Das Gleiche gilt auch für alle weiteren Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „Asthma-Exazerbation und -Regulation“ und „Invertebraten Modelle“. Weiterhin möchte ich mich bei Hanna Angstmann und Karolina Sirocko für die gemeinsame Doktorandenzeit mit seinen Höhen und Tiefen bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Flo, Philipp, Sascha und Vivi, die auch nach dem Masterstudium wichtige Personen in meinem Leben geblieben sind und mich immer wieder aufgebaut haben.

Ich möchte mich außerdem bei Alex bedanken. Er hat mich immer wieder aufgebaut, motiviert und an mich geglaubt. Ohne dich, Alex, wäre die Promotion nicht so angenehm verlaufen. Dies gilt auch für meine Eltern, die mir diesen Weg ermöglicht haben und mich bei allem unterstützen. Ich möchte mich auch bei meiner Oma Gerda bedanken, dass sie immer stolz auf mich ist. Ich weiß, dass auch du, Opa Ernst, stolz gewesen wärst.

